

# CHARAKTERISIERUNG DER BDV-INFEKTION BEI NEUGEBOREN-AEROGEN-INFIZIERTEN RATTEN MITTELS IMMUNHISTOCHEMISCHER METHODEN

**DANIELA SOLLMANN**



## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**édition scientifique**  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen und dem Institut für Immunologie  
des Friedrich-Loeffler-Institutes Tübingen

Betreuer: Prof. Dr. Lothar Stitz

**und**

dem Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

Betreuer: Prof. Dr. Thomas Bilzer

**Charakterisierung der BDV-Infektion bei neugeboren-  
aerogen-infizierten Ratten mittels immunhistochemischer  
Methoden**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Daniela Sollmann**

Tierärztin aus Düsseldorf

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. L. Stitz

Prof. Dr. T. Bilzer

Tag der Disputation: 30.10.2007

Abkürzungen und Begriffe .....	VI
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Das Borna Disease Virus .....</b>	<b>4</b>
2.1.1 Geschichte und Epidemiologie.....	4
2.1.2 Taxonomie und Molekularbiologie .....	6
<b>2.2 BDV-Infektion.....</b>	<b>11</b>
2.2.1 Pferd .....	12
2.2.2 Schaf.....	15
2.2.3 Katze .....	16
2.2.4 Hund .....	18
2.2.5 Tiermodelle .....	19
2.2.5.1 Das Rattenmodell.....	19
2.2.5.1.1 Infektion immunkompetenter Ratten .....	20
2.2.5.1.2 Infektion immuninkompetenter Ratten .....	23
2.2.5.2 Das Mausmodell .....	28
2.2.5.3 Experimentelle Infektion des Gerbils .....	30
2.2.6 Mensch .....	31
<b>3 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Material .....</b>	<b>34</b>
3.1.1 Tiere .....	34
3.1.2 Virus .....	34
3.1.3 Antikörper und Seren .....	34
3.1.4 Chemikalien, Lösungen, Puffer.....	35
3.1.4.1 Chemikalien und Lösungen für Standardfärbungen .....	35
3.1.4.2 Chemikalien und Lösungen für immunhistochemische Färbungen .....	35
<b>3.2 Methoden.....</b>	<b>38</b>
3.2.1 Infektion .....	38
3.2.2 Gewebsentnahme und Präparation .....	38
3.2.3 Einbetten .....	38
3.2.4 Paraffinschnitte.....	39

3.2.5	Entparaffinieren.....	39
3.2.6	Standardfärbungen.....	40
3.2.6.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	40
3.2.6.2	Kresyl-Violett-Färbung (KV, Nissl-Färbung).....	41
3.2.7	Immunhistochemische Färbungen.....	41
3.2.7.1	Darstellung von Gehirnzellen .....	42
3.2.7.1.1	Astrozyten .....	42
3.2.7.1.2	Unreife und reaktive Astrozyten .....	43
3.2.7.1.3	Neuronen.....	45
3.2.7.2	Nachweis von BDV-Antigen .....	47
3.2.7.3	Entzündungszellen .....	48
3.2.7.3.1	CD45-positive Lymphozyten .....	48
3.2.7.3.2	CD8-positive Lymphozyten .....	50
3.2.7.3.3	Mikroglia/Makrophagen .....	51
3.2.8	Eindecken .....	53
3.2.9	Auswertung der Standard- und immunhistochemischen Färbungen .....	53
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>55</b>
4.1	Krankheitsverlauf.....	56
4.2	Neuropathologie .....	58
4.3	Infektionsausbreitung.....	62
4.4	Nachweis von Immunzellen.....	67
4.4.1	Lymphozyten (CD45-positiv) .....	67
4.4.2	Lymphozyten (CD8-positiv) .....	72
4.4.3	Mikroglia/Makrophagen (ED1).....	75
4.5	Zell- und Gewebsreaktionen .....	79
4.5.1	Astroglia.....	79
4.5.1.1	Reife Astrozyten .....	79
4.5.1.2	Unreife und reaktive Astrozyten und Endothelzellen .....	83
4.5.2	Neuronen .....	88
4.6	Vergleich mehrerer Färbungen in der Übersicht.....	92
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>99</b>

<b>5.1</b>	<b>Virusausbreitung .....</b>	<b>100</b>
<b>5.2</b>	<b>Immunologische Reaktion.....</b>	<b>106</b>
<b>5.3</b>	<b>Gewebsreaktion.....</b>	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>121</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>123</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>125</b>

## Abkürzungen und Begriffe

+	positiv
-	negativ
Ad	adult infiziert
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ASD	autism spectrum disorders
BD	Borna Disease, Bornasche Krankheit
BDV	Borna Disease Virus
Bo	Bulbus olfactorius
Cc	Corpus callosum
CD	cluster of differentiation, Zelloberflächenantigene
CIC(s)	zirkulierende(r) Immunkomplex(e)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DG	Gyrus dentatus
ECLIA	Elektrochemischer Lumineszenzimmunoassay
EIA	Enzym-Immunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
fk	fokal
GFAP	saures gliales Faserprotein
ggf.	gegebenenfalls
GP	virales Glykoprotein
HC	Hippocampus
i.c.	intrazerebral
IHC	Immunhistochemie
ISH	In-situ-Hybridisierung
kb	Kilo-Basenpaare



kDa	kilo Dalton
KH	Kleinhirn
L	virale Polymerase
LCA	leucocyte common antigen
M	virales Matrixprotein
MH	Mittelhirn
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger Ribo-Nukleinsäure
N	virales Nukleoprotein
NBAE	neugeboren aerosol (infiziert)
NBI	neugeboren infiziert
NF	Neurofilament
NK	Natürliche Killerzellen
NS	Nervensystem
NSL	Nuclear localisation signal, Kernlokalisations-Signal
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
OT	Objektträger
p.i.	post infectionem
PBMC(s)	periphere mononukleäre Blutzellen
PC	Purkinje-Zellen
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribo-Nukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SD	Staggering disease
SH	Stammhirn
ZNS	Zentrales Nervensystem



# 1 Einleitung

Das Borna Disease Virus (BDV), der Erreger der „Hitzigen Kopfkrankheit“ der Pferde oder der Borna Disease (BD) bei verschiedenen Tierarten, ist ein RNA-Virus der Familie Bornaviridae (Schneemann *et al.*, 1995; de la Torre *et al.*, 1990) in der Ordnung Mononegavirales. Es ist behüllt, einzelsträngig, nicht-segmentiert und gilt als nicht-zytopathogen.

Nicht nur die vielen für ein RNA-Virus untypischen Eigenschaften, auch das sehr breite natürliche Wirtsspektrum, das zahlreiche Säugetierarten und Vögel umfasst, und die große Variabilität des Krankheitsverlaufes machen das BDV zu einem besonderen Erreger.

Während für das BDV früher ein eher begrenztes Verbreitungsgebiet (Süddeutschland und Schweiz) und ein eingeschränktes Wirtsspektrum (Pferd und Schaf) angenommen wurde, haben Untersuchungen der letzten Jahre ein besonders breites Wirtsspektrum und eine große geographische Ausbreitung gezeigt (Bahmani *et al.*, 1996; Caplazi *et al.*, 1994; Dauphin *et al.*, 2001; Galabru *et al.*, 2000; Hagiwara *et al.*, 1996, 2001; Helps *et al.*, 2001; Horii *et al.*, 2001; Kao *et al.*, 1993; Lundgren *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1995).

Obwohl die Krankheit beim Pferd schon am Ende des 19. Jahrhunderts beschrieben wurde, das Virus als Erreger bereits in den 20iger Jahren identifiziert wurde (Zwick, 1939) und der erste Referenzstamm 1929 isoliert werden konnte (*Übersicht in* Dürrwald und Ludwig, 1997), sind immer noch viele Fragen bezüglich der Epidemiologie, der Pathogenese und des zoonotischen Potentials offen.

Auf der anderen Seite macht die hohe Empfänglichkeit vieler Labortiere die experimentelle Infektion von Nagetieren wie Ratten, Mäusen und Gerbilen zu einem attraktiven Modell für die Forschung.

Die Ratte stellt dabei das am häufigsten verwendete Labortier dar und zeigt zwei unterschiedliche charakteristische Verläufe der Krankheit. Zum einen stellt die Infektion der adulten immunkompetenten Ratte, die eine Meningoenzephalitis und eine biphasische Verhaltensstörung ähnlich der natürlichen Infektion des Pferdes und Schafes hervorruft, ein wichtiges Modellsystem für die Erforschung der natürlichen BD und ähnlicher immunvermittelter Krankheiten dar. Zum anderen steht die „persistierende tolerante Infektion der Neugeborenen“ (Bautista *et al.*, 1994; Pletnikov *et al.*, 2002a) zur Verfügung, bei der keine offensichtliche Entzündungsreaktion und klinische Zeichen einer BD bestehen. Diese stellt ein einzigartiges Modell für die Erforschung von Vorgängen und Konsequenzen bei Viruspersistenz im

ZNS und für Mechanismen, mit denen nicht-zytopathogene Viren Verhaltens- und Neuroentwicklungsstörungen in der Abwesenheit von offensichtlicher Entzündung und Zytolyse im ZNS auslösen, dar. Das klinische und pathologische Bild bei diesen Tieren ist reproduzierbar und der Verlauf immer ähnlich, jedoch bestehen Unterschiede in Schweregrad und zeitlichem Verlauf der Krankheit abhängig von dem verwendeten Virusstamm, der Infektionsdosis und dem verwendeten Rattenstamm (Nishino *et al.*, 2002; Oldach *et al.*, 1994; Pletnikov *et al.*, 2002b und 2002c). Bisher führten die intrazerebrale und intranasale Route, jedoch nicht die intravenöse Inokulation zur Infektion (Carbone *et al.*, 1987; *Übersicht in* Jordan und Lipkin, 2001).

Bei der Borna-Enzephalitis von adult-infizierten Ratten, Pferden und Schafen handelt es sich um eine immunvermittelte Krankheit, bei der MHC-I-restringierte CD8<sup>+</sup>-T-Zellen Effektorzellen repräsentieren, die sowohl für die akute Krankheit (charakterisiert durch zelluläre Degeneration) als auch für die chronische Phase (charakterisiert durch kortikale Atrophie) verantwortlich sind (Bilzer und Stitz, 1994; Sobbe *et al.*, 1997). Die akuten Symptome decken sich zeitlich mit dem Auftreten der entzündlichen Reaktion bei allen Infektionsrouten (Carbone *et al.*, 1987; Deschl *et al.*, 1990). Sie klingen mit dieser ab, obwohl das Virus bei solchen Tieren trotz Anwesenheit von neutralisierenden Antikörpern in Serum und zerebrospinaler Flüssigkeit lebenslang im ZNS persistiert (Hatalski *et al.*, 1994; Narayan *et al.*, 1983a; Schneider *et al.*, 1997).

Neonatal intrazerebral infizierte Ratten zeigen keine Entzündungsreaktion und klinische Anzeichen einer typischen Borna-Krankheit, aber Emotions- und Lerndefizite (Rubin *et al.*, 1999), abnorme soziale Interaktionen (Pletnikov *et al.*, 1998) und Anomalitäten in Physiologie und Neuroentwicklung (Bautista *et al.*, 1994; Dittrich *et al.*, 1989; Hornig *et al.*, 1999; Pletnikov *et al.*, 1999b). Die Symptome gehen mit Kleinhirnhypoplasie, fortschreitender Degeneration des Gyrus dentatus und kortikaler Schrumpfung (Bautista *et al.*, 1995; Gonzalez-Dunia *et al.*, 2000; Hornig *et al.*, 1999) einher.

Obwohl Symptome und Pathologie nach intrazerebraler Infektion der neugeborenen Ratte gut dokumentiert und reproduzierbar sind, ist die Pathogenese der Störungen dagegen immer noch weitgehend ungeklärt. Das Spektrum der Änderungen in Verhalten und Neuroentwicklung bei neugeboren-infizierten (NBI)-Ratten hat jedoch bemerkenswerte Parallelen mit einigen der Hauptmerkmale von menschlichen neuropsychiatrischen Störungen wie Schizophrenie und affektiven Krankheiten (Altshuler *et al.*, 1987; Fish *et al.*, 1992; Soares und Mann, 1997). Dies gibt gerade diesem Tiermodell einen besonderen Stellenwert, um die

Pathogenese solcher nicht-immunvermittelter, neurodegenerativer Krankheiten besser verstehen zu lernen.

Insbesondere stellen neonatal infizierte Lewis Ratten ein einzigartiges Modell für Autismus dar (Kemper und Bauman, 1993). Die beobachteten Verhaltensdefizite und Anomalitäten zeigen starke Korrelation mit einigen Kernmerkmalen von autism spectrum disorders (ASD) (Bautista *et al.*, 1994 und 1995; Gillberg, 1999; Hornig *et al.*, 1999, 2001; Lord *et al.*, 2000; Plata-Salaman *et al.*, 1999; Pletnikov *et al.*, 1999a, 1999b und 2000; Rapin und Katzman, 1998; Rubin *et al.*, 1999; Trottier *et al.*, 1999; Tsai, 1999).

Bei den bisherigen neonatalen Modellen wurden die Tiere nach intrazerebraler Infektion untersucht. Hierbei können die Folgen der mechanischen Verletzung des Hirngewebes durch die Injektion und die Veränderungen, die durch die eigentliche Infektion ausgelöst werden, nicht eindeutig voneinander abgegrenzt werden. Daher wurden in dieser Arbeit Gehirne von Ratten untersucht, die neugeboren aerogen/intranasal infiziert wurden.

Diese Art der Infektion stellt nicht nur einen minimal invasiven Eingriff dar, sie dürfte auch dem Weg der natürlichen Ansteckung von Pferden und Schafen entsprechen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Infektion der mit der neuen Methode der aerogenen/intranasalen Infektion neugeborenen infizierten (NBAE-) Ratten näher zu charakterisieren und mit den bisher angewendeten Methoden der Infektion der Ratte und dem Verlauf der Krankheit bei anderen Tierarten zu vergleichen. Dafür wurden Paraffinschnitte von Gehirnen NBAE-infizierter Ratten, Sentinels und Kontrolltiere verschiedenen Alters hergestellt und Färbungen und Immunhistochemie mit verschiedenen Markern durchgeführt, um insbesondere die Virusverbreitung und -verteilung, das Vorhandensein und Ausmaß einer Immunantwort und zelluläre Reaktionen von Astrozyten und Neuronen zu untersuchen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 *Das Borna Disease Virus*

#### 2.1.1 Geschichte und Epidemiologie

Die Bornasche Krankheit oder Borna Disease (BD) oder „Hitze Kopfkrankeheit“ oder „Dummkoller der Pferde“ wurde zum ersten Mal am Ende des 18. Jahrhunderts in Süddeutschland beschrieben, wo sie sporadisch als infektiöse Krankheit des ZNS auftrat. Ihren Namen verdankt sie der Stadt Borna in Sachsen, in der eine große Zahl von Pferden eines Kavallerieregiments während einer Epidemie im Jahr 1895 starben (*Übersicht in Dürrwald und Ludwig, 1997*). Die virale Ätiologie, also die Identifizierung des Pathogens als neues nicht-bakterielles Agens wurde am Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben (Zwick, 1939) und der erste Referenzstamm (strain V) 1929 aus einem kranken Pferd nach einer Serie von Passagen im Kaninchen isoliert (*Übersicht in Dürrwald und Ludwig, 1997*). BD war als eine nicht-eitrige Meningoenzephalomyelitis bei Pferden und Schafen mit oft tödlichem Verlauf in den endemischen Regionen in Deutschland und dem oberen Rheintal zwischen der Schweiz, Österreich und dem Fürstentum Liechtenstein bekannt (Staeheli *et al.*, 2000; Weissenböck *et al.*, 1998a).

Inzwischen wurde BDV in vielen anderen Ländern, auch außerhalb Zentraleuropas wie USA, Japan, China, Iran und Israel (Becht und Rott, 1995; Hagiwara *et al.*, 2001; Herzog *et al.*, 1997; Kao *et al.*, 1993; Nakaruma *et al.*, 1995; Stitz und Rott, 1994), und aus vielen anderen Säugetieren, darunter Rind (Bode *et al.*, 1994; Caplazi *et al.*, 1994; Hagiwara *et al.*, 1996), Kaninchen (Metzler *et al.*, 1978), Hund (Weissenböck *et al.*, 1998a), Zootiere wie Affen, Alpakas und Lamas (Richt *et al.*, 1997; Rott und Becht, 1995) und Wildtiere wie Luchs (Degiorgis *et al.*, 2000) und Fuchs (Dauphin *et al.*, 2001) und Vögeln (Berg *et al.*, 2001; Malkinson *et al.*, 1993) isoliert. Da einheitliche Testverfahren immer noch fehlen und nicht alle Isolate von den gängigen Antikörpern erkannt werden (Haas *et al.*, 1986), sind sowohl das natürliche Wirtsspektrum als auch die geographische Verbreitung laut einiger Autoren wahrscheinlich größer als bisher angenommen (Bahmani *et al.*, 1996; Caplazi *et al.*, 1994;

Dauphin *et al.*, 2001; Galabru *et al.*, 2000; Hagiwara *et al.*, 1996, 2001; Helps *et al.*, 2001, Horii *et al.*, 2001; Kao *et al.*, 1993; Lundgren *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1995).

Außerdem konnten immer mehr Spezies, vom Huhn bis zum Primaten, experimentell infiziert werden und die Infektion der Ratte wurde zu einem wichtigen Modell, um die Immunpathogenese von BDV und die Störungen der neurologischen Entwicklung bei viraler Ätiologie zu studieren (Bilzer und Stitz, 1996; Briese *et al.*, 1999; Gonzalez-Dunia *et al.*, 1997; Stitz *et al.*, 1995).

Überdies wurden in den letzten 14 Jahren spezifische Marker für die BDV-Infektion im Menschen detektiert, besonders bei psychiatrisch erkrankten Patienten, aber das zoonotische Potential des Virus wird immer noch kontrovers diskutiert (Richt und Rott, 2001; Schwemmler *et al.*, 1999; Staeheli *et al.*, 2000).

Die klinische Erscheinung bei einer BDV-Infektion variiert stark von inapparentem Verlauf bis zu schwerer tödlicher Krankheit, abhängig von der infizierten Spezies, dem Immunstatus des Wirts, dem Zeitpunkt der Infektion und dem Virusstamm (näher beschrieben im folgenden bei den einzelnen Tierarten). Die Inkubationszeit beträgt zwei Wochen bis einige Monate.

Der Übertragungsweg für BDV ist bisher noch nicht aufgeklärt. Eine Tröpfcheninfektion wird vermutet, da BDV-RNA in nasalen und konjunktivalen Sekreten und Speichel nachgewiesen wurde (Herzog *et al.*, 1997; Richt *et al.*, 1993) und im frühen Verlauf der Infektion eine entzündliche Reaktion mit Ödem in den olfaktorischen Bulbi von natürlich infizierten Pferden auftritt (Joest und Semmler, 1911; Ludwig *et al.*, 1988). Außerdem findet bei Kohabitation von persistent infizierten Trägartieren mit naiven Ratten eine effektive BDV-Transmission statt, wahrscheinlich durch nasale Infektion mit dem frischen Urin der Trägersinnen, in dem reichlich Virus präsent ist (Sauder und Staeheli, 2003). Die Verbreitung von BDV durch olfaktorische Neuronen zum limbischen System, die in Ratten gezeigt wurde (Carbone *et al.*, 1987; Morales *et al.*, 1988) spricht ebenfalls für diese Transmissionsroute.

Hämatogene Übertragung, beispielsweise mit Insekten als Vektoren für BDV wurde vorgeschlagen, da BDV-Nukleinsäure und -Proteine in peripheren mononukleären Blutzellen gefunden wurden (Rubin *et al.*, 1995; Sierra-Honigmann *et al.*, 1993) und eine saisonale Häufung von BD-Erkrankungen im Frühling und frühen Sommer festgestellt wurde (*Übersicht in* Dürrwald und Ludwig, 1997; Richt *et al.*, 1997), jedoch gibt es hierfür bisher keine weiteren Anhaltspunkte.

Auch wilde Kleinsäuger als Reservoir und Überträger wurden diskutiert, da die experimentelle Infektion neugeborener Ratten in Viruspersistenz mit Ausscheidung von Virus in Speichel, Urin und Faeces resultiert (Herzog *et al.*, 1984; Sierra-Honigmann *et al.*, 1993).

Diese Hypothese konnte trotz Studien an wilden Nagern lange nicht belegt werden (Tsujimura *et al.*, 1999). Eine Untersuchung von 165 wilden Nagern (18 Spezies) auf Antikörper in China ergab keine positiven Ergebnisse (Hagiwara *et al.*, 2001). Erst 2006 gab es den ersten Bericht von infizierten wilden Kleinsäufern in einer Region in der Schweiz, in der BDV bei Pferden und Schafen endemisch vorkommt (Hilbe *et al.*, 2006). Es handelte sich um drei wilde Spitzhörnchen, bei denen BDV im Gehirn nachgewiesen werden konnte. Sie zeigten keine Entzündung oder Degenerationserscheinungen im Gehirn und eine 99,9 %ige Sequenzübereinstimmung mit einem Isolat aus einem Pferd, das in dieser Gegend an BD gestorben war. 2007 berichtet Kinnunen *et al.* (2007) über den Fund von BDV-spezifischen Antikörpern in drei wilden Nagern in Finnland.

Der Fund von BDV in Exkrementen von wilden Vögeln lässt auch diese als mögliches Reservoir von BDV in Frage kommen (Berg *et al.*, 2001).

Über Fälle vertikaler Transmission wurde bislang nur vereinzelt beim Pferd (Dauphin *et al.*, 2001; Hagiwara *et al.*, 2000) und experimentell bei der Maus (Okamoto *et al.*, 2003) berichtet.

Zur Zeit ist die ansteckende Gehirn-Rückenmarkentzündung der Einhufer (Bornasche Krankheit) in Deutschland eine meldepflichtige Tierseuche ( Bundesgesetzblatt 2001 Teil I Nr. 16 S. 540, vom 20. April 2001, geändert durch Bundesgesetzblatt 2001 Teil I Nr. 55 S. 2860 vom 06. November 2001, durch Bundesgesetzblatt 2004 Teil I Nr. 58 S. 2791, vom 12. November 2004, zuletzt geändert am 20.12.2005 durch Bundesgesetzblatt 2005 Teil I Nr. 74, S. 3499, Art. 3 vom 23. Dezember 2005 - Bekanntmachung der Neufassung: Bundesgesetzblatt 2005 Teil I Nr. 74, S. 3516 vom 23. Dezember 2005).

### **2.1.2 Taxonomie und Molekularbiologie**

Bei dem Borna Disease Virus handelt es sich um ein behülltes einzelsträngiges nicht-segmentiertes RNA-Virus mit negativer Polarität und einem helikalen Nucleocapsid. Die Virus-



partikel sind empfindlich gegenüber Hitze, sauren pH-Werten, Lipidlösungsmitteln und Desinfektionsmitteln mit begrenzt viruzider Wirkung. Näheres über die chemisch-physikalischen Eigenschaften ist nicht bekannt (Kaaden, 2002).

Das BDV wurde wie die Filoviridae, Paramyxoviridae und Rhabdoviridae der Ordnung Mononegavirales zugeordnet (Kaaden, 2002). Obwohl es eine diesen ähnliche Genomorganisation aufweist, ist das Genom von BDV mit 8,9 kb (Briese *et al.*, 1994; Cubitt *et al.*, 1994a) kleiner als die anderen Mitglieder dieser Ordnung und repliziert und transkribiert anders als diese im Zellkern infizierter Zellen (Briese *et al.*, 1992; Cubitt *et al.*, 1994; Pyper *et al.*, 1998). Diese Eigenart findet sich innerhalb dieser Ordnung nur noch bei Pflanzenrhabdoviren.

Obwohl unterschiedliche Isolate signifikante Ungleichheit in ihrer phenotypischen Expression zeigen können, ist eine hohe Sequenzkonservierung charakteristisch für BDV (Staeheli *et al.*, 2000). Allerdings wurde aus einem Pferd aus Österreich ein Stamm (No/98) isoliert, der immerhin 15% Unterschied zu den Referenzstämmen V und He/80 aufweist, was die Frage aufwarf, ob nicht weitere bislang noch nicht klassifizierte Subtypen existieren und das BDV-Genom weniger konserviert ist als bisher angenommen (Nowotny *et al.*, 2000).

BDV besitzt eine Vielfalt von Strategien wie das Spleißen von RNA für die Regulation seiner Genomexpression (Cubitt *et al.*, 2001; de la Torre, 1994; Schneemann *et al.*, 1995; Tomanaga *et al.*, 2000). Diese für ein RNA-Virus untypischen Charakteristika machten BDV zum Prototyp einer neuen Familie, den Bornaviridae (Schneemann *et al.*, 1995; de la Torre *et al.*, 1990).

Elektronenmikroskopische Studien zeigten eine sphärische Morphologie mit einem Durchmesser von 70-130 nm (Kohn *et al.*, 1999; Zimmermann *et al.*, 1994). Die Partikel enthalten einen internen elektronendichten Kern von 50-60 nm und eine äußere Hülle, die mit circa 7 nm langen Spikes bedeckt ist (Kohn *et al.*, 1999).

Sechs offene Leserahmen (ORF) wurden in der BDV-Genomsequenz gefunden (de la Torre, 1994; Schneemann *et al.*, 1995), die für sechs Proteine kodieren.

ORF I kodiert für ein Nukleoprotein (N), das in zwei Isoformen vorkommen kann, p38 oder p40, wovon nur p40 ein nukleäres Lokalisationssignal (NSL) aufweist. Daher akkumuliert p38 im Zytoplasma, wenn es in der Abwesenheit von anderen viralen Proteinen exprimiert wird (Kobayashi *et al.*, 1998), jedoch wird es in den Kern transportiert, wenn eine Expression zusammen mit P oder Np40 stattfindet (Kobayashi *et al.*, 1998).

Der zweite Leserahmen ORF II kodiert für das später phosphorylierte Protein p24 (P oder X) (Hsu *et al.*, 1994; Schwemmle *et al.*, 1997; Thiedemann *et al.*, 1992; Thierer *et al.*, 1992). P wirkt der IFN- $\beta$ -Expression im Wirt entgegen und es gibt Hinweise auf einen bisher nicht beschriebenen Mechanismus, mit dem dieses virale Protein die Induktion der antiviralen IFN-Kaskade stört (Unterstab *et al.*, 2005). Außerdem wiesen Schwardt *et al.* (2005) eine negativ regulierende Wirkung von X auf die Polymeraseaktivität nach, so dass die Abwesenheit von X in Viruspartikeln die Polymeraseaktivität in der frühen Infektion fördert.

P10, das sich in BDV-infizierten Zellen findet, ist das Produkt des ORF x1, der mit dem Leseraster des ORF II überlappt (Wehner *et al.*, 1997). In Experimenten zur Identifizierung viraler Proteine, die für das Packen von BDV-RNA-Analogen in infektiöse virusähnliche Partikel notwendig sind, zeigte p10 starke inhibitorische Wirkung auf die RNA-Replikation und -Transkription von BDV-Analogen (Perez *et al.*, 2003 und 2005; Schneider *et al.*, 2003), die jedoch aufgehoben wurde, wenn außer L, N und P auch M und G exprimiert wurden (Perez *et al.*, 2005). Außerdem konnten Wolff *et al.* (2002) zeigen, dass p10 in der Abwesenheit anderer Proteine in den Nukleus eintreten kann ohne das typische NSL aufzuweisen.

Der dritte Leserahmen ORF III kodiert für das Matrixprotein (M) p16, das posttranslational zu gp18 glykolisiert wird (Briese *et al.*, 1994 und 1995; Cubitt *et al.*, 1994a; Kliche *et al.*, 1994). Zwei Beobachtungen sprechen dafür, dass M an der Oberfläche von viralen Partikeln exprimiert wird und die Anlagerung der Virionen an die zellulären Rezeptoren vermittelt: Antisera gegen M haben neutralisierende Aktivität (Hatalski *et al.*, 1994) und die Inkubation empfindlicher Zellen mit M verhindert eine Infektion (Kliche *et al.*, 1994).

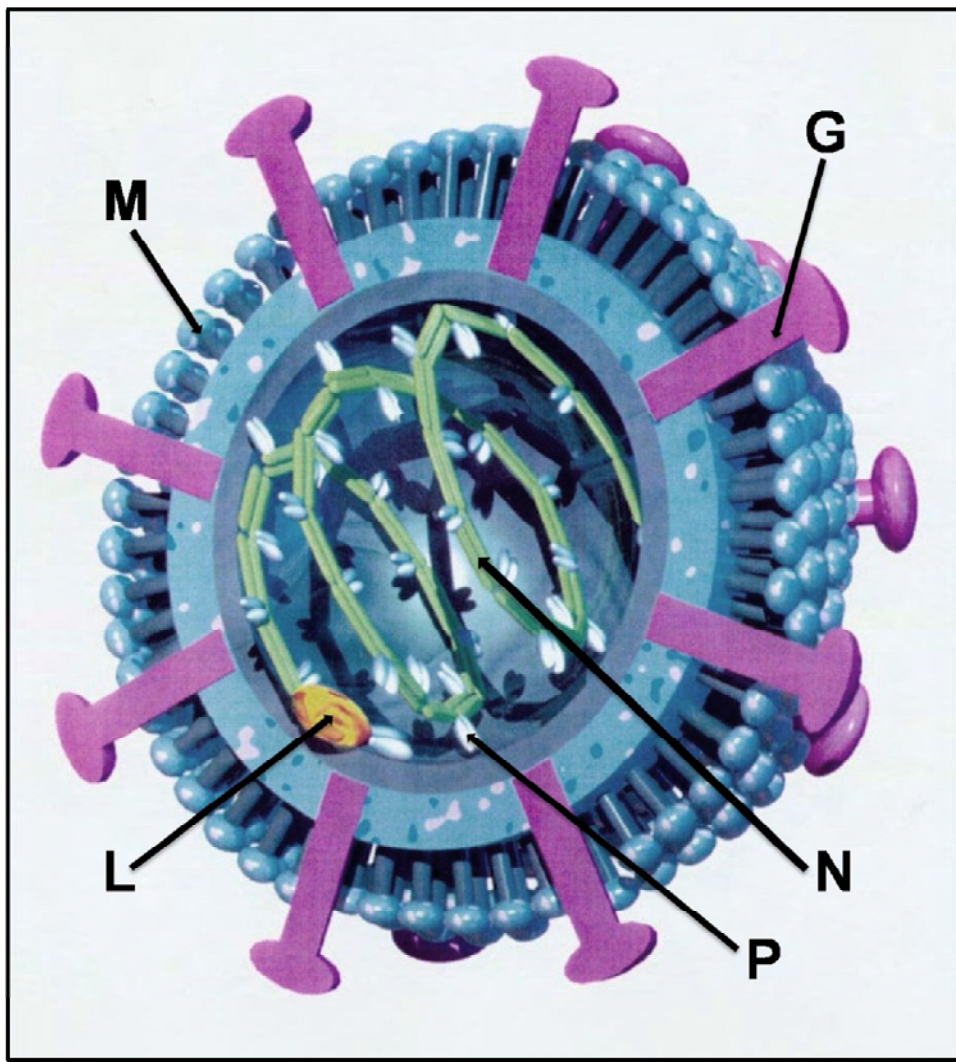
ORF IV kodiert für ein 57 kDa großes Polypeptid, das im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) N-glykolisiert wird und eine Größe von circa 94 kDa erreicht. GP oder gp94 muss weiter prozessiert werden, um Fusionskapazität und damit die Infektiosität von BDV zu erhalten (Richt *et al.*, 1998). Hierzu wird es durch Furin oder eine eng verwandte Protease in zwei Untereinheiten gespalten: GP-N für die Rezeptorbindung und GP-C für die Vermittlung der Fusion zwischen viraler Hülle und Wirtsmembran (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1998; Perez *et al.*, 2001). GP-N und GP-C bilden einen Komplex, der in Viruspartikel inkorporiert wird und zu großen Anteilen in ER und Golgi-Apparat akkumuliert, aber nur in geringer Anzahl an der Oberfläche persistent infizierter Zellen zu finden ist (Eickmann *et al.*, 2005). Dies könnte ein Mechanismus des Virus zur Persistenz sein, zumal Antikörper, die gegen GP gerichtet sind,

neutralisierende Eigenschaften haben und in der Zellkultur die Virusausbreitung komplett verhindern (Bajramovic *et al.*, 2003).

Der fünfte Leserahmen ORF V codiert für ein 190 kDa großes Protein, bei dem es sich um die virale Polymerase L handelt (Briese *et al.*, 1994 und 1995; Cubitt *et al.*, 1994a; Walker *et al.*, 2000).

BDV dringt durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Wirtszelle ein und die Membranfusion findet im sauren Milieu der Endosomen statt (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1998).

Das Nukleokapsid formt zusammen mit viralen Polypeptiden des Polymerase-Komplexes einen Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex, der aktiv in Transkription und Replikation ist und die Minimum-Einheit der Infektiosität darstellt (*Übersicht in* Conzelmann, 1998; Garcia-Sastre und Palese, 1993; Tordo *et al.*, 1992). BDV braucht direkten Zell-Zell-Kontakt zur Verbreitung und wenig oder gar kein infektiöses Virus wird aus BDV-infizierten Zellen (Zellkultur) freigesetzt (Carbone *et al.*, 1993).



**Abbildung 1: Strukturmodell des Borna Disease Virus**

Aus Bode, 1999 nach einer Computersimulation im Magazin „Der Stern“, 1997

*Abkürzungen: M = Matrixprotein (gp 17), G = Glycoprotein (gp94), L = Polymerase (p180/190),  
N = Nukleoprotein (p40), P = Phosphoprotein (p24)*

## 2.2 BDV-Infektion

BDV hat ein außergewöhnlich breites Wirtsspektrum. Neben den natürlichen Wirten gibt es viele Tierarten, die experimentell mit BDV infiziert werden können.

Die intrazerebrale Infektion von Tupajas resultierte in einer Störung, die durch Hyperaktivität und Änderungen im soziosexuellem Verhalten charakterisiert war (Sprankel *et al.*, 1978).

Adult-infizierte Rhesus Affen zeigten eine Meningoenzephalitis und Retinopathie mit initialer Hyperaktivität und folgender Apathie und Hypokinese (Stitz *et al.*, 1981).

Die Infektion von Kaninchen mit Hirnhomogenaten aus kranken Schafen verursachte eine Entzündungsreaktion und klinische Symptome (Beck und Frohböse, 1926).

Beim Rind tritt BD seltener auf als bei Pferd und Schaf, jedoch gibt es Fallberichte aus den 30er Jahren (Ernst, 1931; Zwick, 1939), aus der früheren DDR (Kiupel und Wehr, 1980) und aus der Schweiz (Caplazi *et al.*, 1994) und BDV-Antigen konnte zweifelsfrei in den Gehirnen von neun Rindern mit nicht-eitriger Enzephalitis in Deutschland nachgewiesen werden (Bode *et al.*, 1994). Die Tiere zeigten Appetitlosigkeit, Ängstlichkeit, Zwangsbewegungen, Ataxie und Paresen mit Todesfolge. Die Infektion konzentrierte sich auf Cortexbereiche, Nucleus caudatus, Hypothalamus und Medulla oblongata und war nur geringgradig im Hippocampus nachzuweisen. Auch gibt es latente Infektionen beim Rind (Matthias, 1954). In einem Bestand in Nordostdeutschland, in dem Fälle von BD aufgetreten waren, wurde eine Seroprävalenz von 40,4% beschrieben (Bode *et al.*, 1994). In Japan (Hokkaido) waren bei einer Untersuchung von gesunden Rindern 20,3% positiv für p24 (Hagiwara *et al.*, 1996).

Auch gibt es immer wieder Berichte von BDV-positiven Wildtieren. So wurde RNA in Hirnproben von Rotfüchsen gefunden. Allerdings gab es in diesen Fällen keine Informationen über den klinischen Zustand der Tiere (Dauphin *et al.*, 2001). Bei einem verhaltensauffälligen Luchs in Schweden, der eine nicht-eitrige Meningoenzephalitis aufwies, wurde BDV-RNA in Neuronen und Gliazellen detektiert (Degiorgis *et al.*, 2000).

Die Funde von BDV-Infektionen bei Vögeln waren insofern von besonderer Bedeutung, als diese Art als Reservoir für das Virus in Betracht kommt und das Wirtsspektrum sogar über Säugetiere hinausgeht. Frühere Experimente zeigten Küken von Haushühnern hochempfindlich für experimentelle BDV, während adulte Hühner und Tauben resistenter zu sein schienen (Rott und Becht, 1995). Schon früh gelang die Anzüchtung von infektiösem BDV in

bebrüteten Hühnereiern und die anschließende Übertragung auf das Kaninchen (Nitzschke und Rott 1957; Rott und Nitzschke 1958). In Schweden fanden sich in einer Gegend, in der feline BD regelmäßig vorkommt, verschiedene Wildvögel positiv für BDV-RNA (Berg *et al.*, 2001). Außerdem wurde BDV als wahrscheinliches kausatives Agens bei gezüchteten Straußen mit Paralyse in Israel identifiziert (Malkinson *et al.*, 1995).

Am besten dokumentiert ist die BDV-Infektion aber immer noch bei den natürlichen Wirten Pferd, Schaf und Katze sowie den Nagetieren, die experimentell infiziert als Modell für die Forschung dienen. Außerdem gibt es gut dokumentierte Einzelfälle von BD beim Hund.

### 2.2.1 Pferd

Das Pferd war die erste Tierart, bei der BD beobachtet wurde. Seitdem das Agens identifiziert und Testmethoden entwickelt wurden, ist klar, dass die Mehrzahl der Infektionen beim Pferd subklinisch verlaufen. Virale Persistenz ohne erkennbare Krankheit wurde mehrfach bei natürlich infizierten Pferden in Europa, Asien (Ihlenburg und Brehmer, 1964; Lange *et al.*, 1987; Nakamura *et al.*, 1995) und Nordamerika (Kao *et al.*, 1993) beschrieben. In Deutschland entwickeln nur circa 10% der infizierten Pferde Verhaltensstörungen (Dieckhöfer *et al.*, 2004).

Die Seroprävalenz von BDV-spezifischen Antikörpern in klinisch gesunden Pferden variiert stark in verschiedenen Gebieten und Ländern. In Deutschland wird sie im Durchschnitt mit 11,5% beschrieben (Herzog *et al.*, 1994), in endemischen Gebieten mit bis zu 22,5% (Richt und Rott, 2001). Eine neuere Studie, bei der zirkulierende Immunkomplexe (CICs) im Serum detektiert wurden, zeigte eine Prävalenz von 60% (Dieckhöfer *et al.*, 2004). In Japan beschrieben Nakamura *et al.* (1995) eine hohe Seroprävalenz von 29,8%, in Teheran waren es 18,1% (Bahmani *et al.*, 1996), in der Türkei fanden sich ähnlich wie in Schweden (Berg *et al.*, 1999) 25% der getesteten klinisch gesunden Pferde positiv (Yilmaz *et al.*, 2002). Eine Studie in Australien fand mit verschiedenen Methoden keinen Hinweis auf eine BDV-Infektion bei Pferden (Kamhieh *et al.*, 2006).

Es ist fraglich, inwieweit diese Ergebnisse wirklich vergleichbar sind, da keine einheitlichen Methoden verwendet wurden und der Nachweis von Antikörpern und Antigen nicht immer

gleiche Ergebnisse liefert (Bahmani *et al.*, 1996). Eine Studie über vier Jahre bei 130 Wildpferden in Japan zeigte, dass zwar zwölf Tiere dauerhaft positiv waren, aber elf Tiere von seronegativ zu seropositiv und sieben von seropositiv nach seronegativ konvertierten (Inoue *et al.*, 2002). Außerdem ist gezeigt worden, dass selbst Pferde, die an akuter BD gestorben waren und experimentell infizierte Ponys teilweise keine BDV-spezifischen Antikörper aufweisen (Katz *et al.*, 1998).

Bode *et al.* (2001) berichteten, dass BDV-Antigen (gebunden an PBMCs und frei im Plasma) und zirkulierende Immunkomplexe (CICs) die verlässlichsten Marker für BDV-Infektionen bei Tier und Mensch sind. Die Gültigkeit dieser Befunde wird jedoch insbesondere durch zwei jüngere Publikationen angezweifelt, die die Spezifität dieser Nachweise grundsätzlich in Frage stellen (Wolff *et al.*, 2006a und 2006b). Plasma-Antigenämie und CICs könnten die Detektion von viralem RNA in der Abwesenheit von Antikörpern erklären (Vahlenkamp *et al.*, 2000).

Das klinische Bild der BD beim Pferd äußert sich in gleichzeitigen oder aufeinanderfolgenden Störungen in Verhalten, Sensibilität und Motilität (*Übersicht in* Dürrwald und Ludwig, 1997).

Während der initialen Phase können unspezifische Zeichen wie Hyperthermie, Anorexie und Wechsel von Kolik und Konstipation beobachtet werden. Während der akuten Phase treten Symptome einer Meningoenzephalitis auf: Verhaltensänderungen, Hypokinesen und Bewegungsanomalien. Diese Zeichen können mit abnormalen Reaktionen auf externe Stimuli wie erhöhte Reizbarkeit, Aggression, Lethargie, Somnolenz und Stupor einhergehen. In der Terminalphase kommt es zu Bewusstseinsstörungen und dem Verlust der Propriozeption bis hin zu Paralyse und Sehstörungen.

Wiederholungsbewegungen wie leere Kaubewegungen und Laufen im Kreis oder gegen Hindernisse sind bei Pferden wie auch bei Schafen häufig.

Auch drei experimentell infizierte Ponys zeigten die typischen Symptome von BD, wobei zwei Tiere nach 28 und 30 Tagen starben und eines sich wieder erholte (Katz *et al.*, 1998).

Die akute Mortalität bei an BD erkrankten Pferden liegt bei 80-100% (Rott und Becht, 1995).

Die klassische BD wird nach ein bis zwei Wochen offenkundig und der Tod tritt in der Regel nach ein bis drei Wochen ein (*Übersicht in* Dauphin *et al.*, 2002).

Bei Tieren, die die akute Phase überleben, können wiederkehrende Krankheitsphasen mit Depression, Apathie, Somnolenz und Angst, besonders nach Stress, für den Rest des Lebens auftreten (*Übersicht in* Dürrwald und Ludwig, 1997; Richt und Rott, 2001).

Die klinische Diagnose der Meningoenzephalitis kann durch eine erhöhte Zellzahl im Liquor cerebrospinalis und einem erhöhten Druck bei der Punktion bestätigt werden (Bilzer *et al.*, 1996).

Natürlich infizierte und spontan an BD erkrankte Pferde und Esel zeigen in der postmortalen Untersuchung eine schwere disseminierte lymphozytäre Polioenzephalitis mit ausgeprägten perivaskulären und zellulären Ödemen und Nervenzellnekrosen. Der überwiegende Teil der infiltrierenden Lymphozyten besteht aus T-Zellen, davon sind circa 60% CD4-positiv (vornehmlich perivaskulär) und 20-30% CD8-positiv (überwiegend intraparenchymatös). Außerdem ist eine Mikrogliose zu beobachten (Bilzer *et al.*, 1996) und wie auch beim Rind gelegentlich, aber nicht zwangsläufig, intranukleäre eosinophile Joest-Degen-Einschlußkörperchen in Neuronen (Caplazi und Ehrensperger, 1998; Gonzalez-Dunia *et al.*, 1997; Stitz *et al.*, 1995; Weissenböck *et al.*, 1998b). Experimentell infizierte Ponys zeigten perivaskuläre Infiltrate, gliale Knoten und Astrozytose (Katz *et al.*, 1998).

Während der Nachweis von virusspezifischen Proteinen und BDV-RNA im Gehirn erkrankter Pferde in fast allen Fällen gelingt, variiert deren Verteilung. Das Verteilungsmuster von RNA und Antigen ist oft ähnlich, stimmt jedoch nicht immer überein. Der Schwerpunkt der Infektion liegt dabei im Bulbus olfactorius, Großhirncortex, Nucleus caudatus, Ammonshorn, Gyrus cinguli und der Retina (Bilzer *et al.*, 1996; Lebelt und Hagenau, 1996). Der Liquor war bei elf untersuchten Tieren RNA-negativ, innerhalb des Rückenmarks nahm die Nachweishäufigkeit nach kaudal ab und vereinzelt konnte BDV-RNA im Ganglion trigeminale, in der Nasenschleimhaut, der Glandula parotis, im Herzmuskel, der Lunge, der Leber, der Niere, der Harnblasenwand und dem Ovar, in zwei von sieben Fällen in Sekreten, jedoch nicht in der Milz, der Nebenniere, dem Dünndarm und den Hoden nachgewiesen werden (Lebelt und Hagenau, 1996). Bilzer *et al.* (1996) und Hagiwara *et al.* (1997a) dagegen fanden in keinem von zehn, bzw. sechs untersuchten Tieren das autonome Nervensystem oder Körperorgane betroffen.

Meist waren Neurone, Astrozyten und Ependymzellen infiziert (Bilzer *et al.*, 1996; Caplazi



und Ehrensperger, 1998).

Über einen Fall von vertikaler Übertragung von BDV wurde beim Pferd berichtet. Eine Stute mit klinischem Verdacht auf BD wurde euthanasiert und postmortal untersucht. Sowohl ihr Gehirn, das Degeneration und Nekrosen zeigte, als auch das des Fetus, das ansonsten unauffällig war, waren positiv für BDV-RNA mit identischer Nukleotidsequenz (Hagiwara *et al.*, 2000).

### 2.2.2 Schaf

Nach dem Pferd ist das Schaf die zweite Spezies, bei der BD am Ende des letzten Jahrhunderts beschrieben wurde (Walther, 1899). Seitdem gibt es Berichte von BD beim Schaf aus vielen Ländern wie Deutschland, der Schweiz, Liechtenstein, Italien, China und Japan (Caplazi *et al.*, 1999; Hagiwara *et al.*, 1997 und 2001; Ludwig und Bode, 2000; Metzler *et al.*, 1976; Waelchli *et al.*, 1985). Natürlich auftretende BD scheint jedoch trotz uneingeschränkter Handels mit Schafen innerhalb Zentraleuropas immer noch auf bestimmte Gebiete beschränkt zu sein, in denen sie bei dieser Spezies endemisch auftritt und eine saisonale Häufung zwischen März und September aufweist (Caplazi *et al.*, 1999; *Übersicht in* Dürwald und Ludwig, 1997).

Eine 3-Jahres-Studie einer Schafherde (circa 25 Tiere) in Südostdeutschland ergab eine Seroprävalenz zwischen 11,5% und 19,4% bei nur einem Fall von BD, wobei in den meisten Tieren nur temporär Antikörper detektiert werden konnten, ebenfalls mit einer Häufung in Frühling und Frühsommer (Vahlenkamp *et al.*, 2002). In der Schweiz waren auch im Endemiegebiet nur 6% seropositiv, in nicht-endemischen Gegenden nur 2% (Muller-Doblies *et al.*, 2004). In Japan fanden Hagiwara *et al.* (1997) bei gesunden Lämmern sogar eine Seroprävalenz von bis zu 51,7% (BDV-RNA), bzw. bis zu 33,3% bei adulten Tieren (Antikörper gegen p24), die damit höher war als bei Pferden, Rindern und Katzen der gleichen Gegend.

Wie es auch beim Pferd beobachtet wurde, sind an BD erkrankte Schafe nicht immer seropositiv (Muller-Doblies *et al.*, 2004).

Die klinischen Symptome und der Verlauf der Krankheit ähneln denen des Pferdes, wobei die Mortalität beim Schaf mit 50% etwas niedriger beschrieben wird (Rott und Becht, 1995). Die

überlebenden Tiere erholen sich von den akuten Symptomen (Metzler *et al.*, 1979) oder haben permanente neurologische Defizite. Auch eine Wiederkehr der akuten BD (Heinig, 1969) und virale Persistenz ohne Krankheit (Matthias, 1954; Hagiwara *et al.*, 1997) wurde bei natürlich infizierten Schafen beschrieben.

Die postmortale Untersuchung des Gehirns natürlich infizierter Schafe zeigt perivaskuläre, parenchymale und meningeale Infiltrate, wobei wie beim Pferd im allgemeinen CD4-positive Zellen eher perivaskulär und CD8-positive mehr parenchymatös zu finden sind. Makrophagen und B-Zellen sind weniger häufig zu sehen (Caplazi *et al.*, 1998). Alles in allem scheint beim Schaf wie auch bei den experimentell infizierten Ratten und Mäusen die Pathogenese von BD durch eine T-Zell-abhängige Immunreaktion verursacht zu sein (Bilzer *et al.*, 1995; Enbergs *et al.*, 2001; Kao *et al.*, 1984; Narayan *et al.*, 1983a). In einer Untersuchung von zwölf Schafen und elf Equiden, die an BD erkrankt waren, waren histologisch keine Anzeichen einer chronischen BD wie extensiver Neuronenverlust und Hirnatrophie zu finden (Caplazi und Ehrensperger, 1998), wie es bei Ratten beobachtet wurde (Bilzer und Stitz, 1994). Daher scheint bei diesen Tierarten der Verlauf normalerweise akut oder subakut (seltener beim Schaf) zu sein, was auch den klinischen Beobachtungen entspricht. Infizierte Zellen beim Schaf sind vor allem Neuronen (Caplazi und Ehrensperger, 1998).

### 2.2.3 Katze

Bei Katzen gilt die sogenannte „staggering disease“ (SD) als Gegenstück zur BD. Dabei handelt es sich um eine spontane nicht-eitrige Meningoenzephalomyelitis mit klinischen Zeichen von Ataxie und Verhaltensstörungen, die erstmals in Schweden beschrieben wurde. Die Prävalenz von BDV-spezifischen Antikörpern bei diesen Tieren ist höher als bei zufällig gewählten Katzen ohne neurologische Symptome (Kronevi *et al.*, 1974; Lundgren, 1992; Lundgren *et al.*, 1993; Lundgren und Ludwig, 1993; Nakaruma *et al.*, 1996; Nishino *et al.*, 1999; Nowotny und Weissenböck, 1995; Reeves *et al.*, 1998). Außerdem konnte BDV aus Katzen mit „staggering disease“ isoliert werden (Lundgren *et al.*, 1995) und Katzen, die experimentell mit diesem Isolat infiziert wurden, entwickelten neurologische Zeichen einer Enzephalitis (Lundgren *et al.*, 1997). Die „staggering disease“ wurde erstmals in Schweden beschrieben (Lundgren *et al.*, 1992), aber von ähnlichen Enzephalitiden wurde auch aus

Österreich (Weissenböck *et al.*, 1994), Australien (Borland und McDonald, 1965) und den USA (Vandevelde und Braund, 1979) berichtet, auch von viraler Persistenz ohne Krankheit bei natürlich infizierten Katzen (Nakamura *et al.*, 1996).

In Japan waren 46% von 52 Hauskatzen mit neurologischen Symptomen positiv für Antikörper gegen p10 und/oder p24, aber nur 23,7% von 152 Katzen ohne neurologische Symptome (Ouchi *et al.*, 2001) bzw. 66,7% von 15 neurologisch kranken Katzen in der Gegend von Tokyo (Nakaruma *et al.*, 1999a). Andere Studien in Asien geben die Seroprävalenz in neurologisch unauffälligen Katzen mit 13,3% (Nakaruma *et al.*, 1996), 18,8% (Nishino *et al.*, 1999) bzw. 3,1% in Japan, 2,0% in Indonesien und 3,8% auf den Philippinen an (Horii *et al.*, 2001).

Katzen mit „staggering disease“ zeigen histologisch alle typischen Zeichen einer viralen Entzündung des zentralen Nervensystems: Neuronophagie, Mikrogliose und schwere perivaskuläre mononukleäre Zellinfiltrate (Lundgren, 1992).

Von acht Katzen, die experimentell mit BDV infiziert wurden, zeigten drei neurologische Störungen und eine nicht-eitrige Enzephalitis (Lundgren *et al.*, 1997). Alle erholten sich vom akuten Stadium und zeigten eine Serokonversion und neutralisierende Antikörper, aber nicht alle Tiere konnten das Virus komplett eliminieren. In unterschiedlichem Ausmaß waren perivaskuläre und parenchymale Infiltrate, Neuronophagie, Mikrogliose, Myelinverlust und axonale Degeneration zu finden, außerdem Plasmazellen in der Nähe von Neuronen. Es war hauptsächlich oder nur die weiße Substanz betroffen.

Experimentell infizierte Katzen zeigten eine stärkere Immunantwort gegen p24 und p40 als natürlich infizierte Tiere (Johansson *et al.*, 2002).

Die Gehirnautopsie einer BDV-Antikörper-positiven Katze mit neurologischen Störungen zeigte nur bestimmte Hirnregionen wie den Bulbus olfactorius und die Medulla cerebri positiv für BDV-RNA (schwach auch in der Medulla oblongata und dem Kleinhirn). Positive Zellen waren überwiegend Neurone. Histologisch fanden sich schwere axonale Degeneration, Verlust von Myelin, Neuronophagie und leichte mononukleäre Zellinfiltration in manchen

Arealen der Medulla cerebri, aber keine Anomalitäten im Bulbus olfactorius (Nakaruma *et al.*, 1999a).

Ein atypischer Fall wurde von Berg und Berg (1998) beschrieben: Bei einer dreieinhalb-jährigen Katze mit Muskelfaszikulationen und propriozeptiven Defiziten wurden zahlreiche BDV-positive Neurone gefunden. Histologisch fanden sich Nekrosen von Muskelfasern, aber keine Entzündung.

Der erste veröffentlichte Fall einer felines BD bei einem Wildtier trat 1999 in Schweden auf. Ein Luchs mit auffällig apathischem Verhalten wurde in einer Gegend, in der Fälle von feline BD bei Hauskatzen auftreten, erlegt. Die histologische Untersuchung des Gehirns ergab eine mittelgradige bis schwere nicht-eitrige Meningoenzephalitis in allen Hirnarealen, besonders in basalen Ganglien, im Thalamus und der Pons, charakterisiert durch mononukleäre Infiltrate, Neuronophagie und mikrogliale Noduli, außerdem Lymphozyten und Plasmazellen im neuralen Parenchym, teilweise in der Nähe von Neuronen. Die In-situ-Hybridisierung und die Immunhistochemie zeigten zahlreiche Neurone und Gliazellen positiv für BDV-RNA mit einer Korrelation zwischen Entzündungsläsionen und positiven Zellen. Antikörper im Blut wurden nicht gefunden (Degiorgis *et al.*, 2000).

#### **2.2.4 Hund**

Der erste Bericht eines an BD erkrankten Hundes wurde 1998 in der Schweiz veröffentlicht (Weissenböck *et al.*, 1998a). Eine zwei Jahre alte Husky-Hündin wurde 1994 mit schweren zentralnervösen Störungen eingeschläfert. Sie zeigte histologisch eine lymphozytäre Meningitis, perivaskuläre lymphozytäre Infiltrate, neuronale Nekrose im Neocortex, Allocortex und Hippocampus, subpiale endotheliale Zellschwellung und fokale Gliose. Die Läsionen waren am schwersten im Lobus piriforme, rostralen Cortex, der periventrikulären grauen Substanz, im Hippocampus und Mesencephalon, geringer im occipitalen Neocortex, der Medulla oblongata und dem Kleinhirn. Während die Verteilung der BDV-Proteine in der Immunhistochemie der beim Pferd beobachteten ähnlich war (starke Immunreaktion in Arealen mit schwerer Enzephalitis, in anderen Gebieten weniger diffus und begrenzt auf Gruppen von Zellen; Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten infiziert), waren die hier beobachteten

perivaskulären Zellansammlungen mit Infiltration der Entzündungszellen ins angrenzende Neuroparenchym ohne bedeutende neuronale Veränderungen auffallend anders und könnten von einer Ischämie des Cortex herrühren und nicht primär viraler Effekt sein. Einige Neurone hatten einzelne oder mehrere eosinophile intranukleäre Joest-Degen-Einschlußkörperchen.

Von einem weiteren BDV-positiven Hund mit schwerer ZNS-Symptomatik wurde 2002 in Japan berichtet (Okamoto *et al.*, 2002). Auch dieser drei Jahre alte Welsh Corgie zeigte histologisch eine nicht-eitrige Enzephalomyelitis mit großen perivaskulären Infiltraten bestehend aus Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen, fokaler Gliose und Neuronophagie.

### **2.2.5 Tiermodelle**

Die experimentellen Infektionen von Versuchstieren mit BDV stellen wichtige und vielseitige Modelle für die Erforschung von Mechanismen von persistierenden Viren und Abwehrmechanismen des ZNS dar.

#### **2.2.5.1 Das Rattenmodell**

Die BDV-Infektion der Ratte ist das beliebteste experimentelle Modell, um die Pathogenese von BDV zu studieren (Gosztonyi und Ludwig, 1995; Stitz *et al.*, 1995). Außerdem stellt sie ein wichtiges Modellsystem für die Erforschung immunvermittelter pathologischer Vorgänge in virusinduzierten neurologischen Krankheiten dar, für Mechanismen und Konsequenzen von Viruspersistenz im ZNS und für Strategien, mit denen Viren Verhaltens- und Neuroentwicklungsstörungen in der Abwesenheit von offensichtlicher Entzündung und Zytolyse im ZNS auslösen.

Obwohl das klinische und pathologische Bild bei den adult, bzw. neugeboren intrazerebral infizierten Ratten immer ähnlich ausfällt und reproduzierbar ist, finden sich gewisse Unterschiede im Schweregrad und zeitlichen Verlauf der Krankheit abhängig von dem verwendeten Virusstamm, der Infektionsdosis und dem verwendeten Rattenstamm. So fanden sich schwerere klinische Symptome und mehr neuropathologische Veränderungen nach Infektion

mit der Maus-adaptierten Variante CRNP5 als bei Verwendung der Ratten-adaptierten CRP3 (Nishino *et al.*, 2002). Außerdem wurden mehr pathologische Veränderungen in neonatal infizierten Fisher Ratten als in Lewis Ratten festgestellt (Pletnikov *et al.*, 2002b und 2002c). Die Infektion von entwöhnten Ratten mit niedrigen Dosen eines in der Zellkultur adaptierten BDV zeigte die typische BD, jedoch um circa einen Monat verzögert, während die Verwendung einer hohen Dosis desselben nur eine milde Enzephalitis und keine typischen BD-Symptome verursachte (Oldach *et al.*, 1994).

Bisher führten Routen der Inokulation, die dem Virus Zugang zu Nervenenden erlauben, insbesondere die intrazerebrale und intranasale Route, zu einer Infektion bei Ratten (*Übersicht in* Jordan und Lipkin, 2001), während eine intravenöse Inokulation nicht in einer BDV-Infektion resultierte (Carbone *et al.*, 1987). Bei den meisten bisher durchgeführten Studien wurden die Tiere intrazerebral infiziert.

#### 2.2.5.1.1 Infektion immunkompetenter Ratten

Die experimentelle Infektion von adulten Ratten ähnelt in vielerlei Hinsicht der natürlichen BD bei Pferden und Schafen.

Die adult infizierte immunkompetente Ratte entwickelt eine immunvermittelte biphasische Verhaltensstörung. Apathie, Somnolenz und Depression folgen dem initialen aggressiven hyperaktiven Verhalten. Die chronische Phase ist charakterisiert durch einen stetigen Rückgang der inflammatorischen Reaktion trotz der kontinuierlich hohen Viruslast im ZNS.

5-10 % der Tiere werden fettleibig (Obesitas) und erreichen bis zu 300% des normalen Körpergewichts (Ludwig *et al.*, 1988). Diese Tiere zeigen außerdem eine lympho-monozytäre Inflammation des Hypothalamus, Hyperplasie von Pankreasinseln und erhöhte Glucose- und Triglyzerid-Werte im Serum. Das Auftreten des BDV-induzierten Obesitas Syndroms variiert mit dem Alter der Tiere, dem Zeitpunkt der Inokulation, dem genetischen Hintergrund der Wirtstiere und dem verwendeten Virusstamm (Gosztonyi und Ludwig, 1995). Ein Teil der adult-infizierten Tiere, die die akute Enzephalitis überleben, entwickeln die erwähnte Fettleibigkeit (Gosztonyi *et al.*, 1991).

Die Immunantwort befreit nicht vom Virus, die Entzündung klingt ab und Virus persistiert trotz hoher Titer von neutralisierenden Antikörpern in Serum und zerebrospinaler Flüssigkeit in überlebenden Tieren lebenslang in konstanten Mengen im ZNS (Hatalski *et al.*, 1994;

Narayan *et al.*, 1983a; Schneider *et al.*, 1997). Das Virus persistiert in autonomen Nervenfasern und nahezu allen Geweben. Nicht-neuronale Zellen in Niere und Darm können in der späteren chronischen Phase infiziert werden (Stitz *et al.*, 1998).

Hohe virale Genexpression im limbischen System zusammen mit Astrozytose und neuronalen Strukturveränderungen innerhalb der Hippocampusformation sind die histopathologischen Hauptkennzeichen der BDV-Infektion.

BDV-Antigen ist nach wenigen Tagen detektierbar und findet sich im Neuropil, Neuronen, neuronalen Fortsätzen, Astrozyten, Ependymzellen und Oligodendrozyten, aber nie in Entzündungszellen (Herden *et al.*, 2005). In Neuronen kann virales Antigen ab Tag 3-6 p.i. detektiert werden, in Astrozyten ab Tag 10 p.i. (Stitz *et al.*, 1998).

Das Auftreten von klinischen Anzeichen deckt sich zeitlich mit dem Auftreten einer entzündlichen Reaktion mit einer Latenz von 2-4 Wochen bei allen Infektionsrouten (Carbone *et al.*, 1987; Deschl *et al.*, 1990). Diese Entzündungsreaktion, die ihren höchsten Grad 30-40 Tage p.i. erreicht, führt zu neuronaler Destruktion, die in manchen Fällen zu einem Hydrocephalus führt. Sowohl CD4- als auch CD8-positive Zellen sind in den Zellinfiltraten präsent (Deschl *et al.*, 1990) und ihre Elimination oder funktionale Blockade verhindert sowohl BDV-induzierte Symptome als auch histopathologische Veränderungen im Gehirn (Bilzer und Stitz, 1996; Stitz *et al.*, 1991).

Aus dem Gehirn akut erkrankter Tiere isolierte Lymphozyten erwiesen sich als MHC-I-abhängige zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und die Expression von MHC-I-Antigen wird in Astrozyten und Neuronen gefunden (Bilzer und Stitz, 1995; Planz *et al.*, 1983). MHC-I-abhängige CD8<sup>+</sup>-T-Zellen repräsentieren Effektorzellen, die sowohl für die akute Krankheit (charakterisiert durch zelluläre Degeneration) als auch für die chronische Phase (charakterisiert durch kortikale Atrophie) verantwortlich sind (Bilzer und Stitz, 1994; Planz *et al.*, 1983; Sobbe *et al.*, 1997). Transfer-Experimente, bei denen Lymphozyten aus BD erkrankten Ratten isoliert und in immunsupprimierte infizierte Tiere transferiert wurden, zeigten, dass T-Zellen, die aus dem Gehirn gewonnen wurden, hohe lytische Aktivität gegen Zielzellen aufwiesen und BD in den Rezipienten verursachten. Dagegen zeigten Lymphozyten aus der Peripherie (Milz und zervikale Lymphknoten, nicht aus mesenterialem lymphoidem Gewebe) erst nach Restimulierung (Co-Kultivierung mit BDV-infizierten Fibroblasten) zytotoxische Aktivität und verursachten nach Transfer BD-ähnliche Symptome (Batra *et al.*, 2003; Planz *et al.*, 1993; Sobbe *et al.*, 1997). Der adoptive Transfer von BDV-N-spezifischen CD4-Zelllinien

erhöht oder verhindert die immunpathologische Krankheit, abhängig vom Zeitpunkt des Transfers relativ zur Infektion (Richt *et al.*, 1989). Bei einem Impfversuch mit BDV-spezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Zelllinie ohne zytolytische Aktivität) vor der Infektion konnte die Infektion verhindert werden. Die Tiere zeigten nur eine geringgradige vorübergehende Enzephalitis, kurzfristige Virusreplikation im Gehirn und konnten danach das Virus komplett eliminieren (Nöske *et al.*, 1998). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu der beobachteten Elimination des Virus unterstützend wirken, dass die Effektorzellen jedoch virusspezifische MHC-Klasse I restringierte zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sind. Es ergaben sich für die Ratte Hinweise, dass die zytotoxische Aktivität der virusspezifischen T-Zellen Perforin-vermittelt ist (Sobbe *et al.*, 1997). In Tieren mit Encephalitis bestand eine Korrelation zwischen dem Auftreten von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in Hirnläsionen und einer Aufregulierung der Perforin-mRNA.

Neben einer Reaktion des spezifischen Immunsystems werden bei der Infektion der adulten Ratte auch Astrozyten und Mikroglia aktiviert. Astroglie ist ab dem 24. Tag p.i. zu beobachten wie auch Zellen mit mikroglialer Morphologie (Herdén *et al.*, 2005; Deschl *et al.*, 1990), die IL-16-positiv sind, was für eine Aktivierung selbiger spricht und auch in Zusammenhang mit der Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-Zellen steht (Guo *et al.*, 2003).

Obwohl Antikörper gegen N und P, die während der akuten Phase der Krankheit gebildet werden, nicht neutralisierend sind (Furrer *et al.*, 2001), steigen Antikörper mit neutralisierender Kapazität nach der akuten Phase drastisch an (Hatalski *et al.*, 1994) und spielen wahrscheinlich eine Rolle in der Restriktion des Virus auf neurales Gewebe (Stitz *et al.*, 1998).

Außerdem kommt es wahrscheinlich als Folge der Entzündung zu Veränderungen im Neurotransmittersystem, einschließlich Änderungen im Dopaminsystem, und Veränderungen der Menge von mRNA von Cholecystokin, Glutamic acid decarboxylase und Somatostatin (Solbrig *et al.*, 1996a; Lipkin *et al.*, 1997).

Bei adult intrazerebral infizierten Ratten konnte während der Entstehung der Enzephalitis ein progressiver Verlust von Cholin-Acetyltransferase- und Acetylcholinesterase-Aktivität in Cortex und Hippocampus gezeigt werden (Gies *et al.*, 1998 und 2001). Der Rückgang dieser Enzyme war in der präenzephalitischen Phase gering, wurde aber mit dem Auftreten einer



Entzündung signifikant und könnte unter anderem für die bei BD erkrankten Ratten beobachteten Symptome verantwortlich sein. Außerdem fanden Gies *et al.* (1998) schon ab Tag 6 p.i. geschwollene und degenerative Axone, die als Zeichen für gestörten axonalen Transport gelten.

Korrelierend mit dem Grad der Entzündung und der Schwere der neurologischen Symptome erhöhen sich die mRNA-Mengen an IL-6, TNF- $\alpha$  und iNO (Stitz *et al.*, 1995).

Wie auch bei Autismus (Anderson, 1994; Ernst *et al.*, 1997), Schizophrenie (Cooper *et al.*, 1991) und affektiven Störungen (Hamner und Diamond, 1996; Kelsoe *et al.*, 1996; Partonen, 1996), stehen Störungen der Motorik und des Verhaltens in adulten BD-Ratten in Verbindung mit bestimmten Veränderungen der Dopamin-Systeme im ZNS (Solbrig *et al.*, 1994, 1995, 1996a, 1996b und 1998) und Serotonin-Anomalitäten (Solbrig *et al.*, 1995).

#### 2.2.5.1.2 Infektion immuninkompetenter Ratten

Die Infektion neonataler Ratten verursacht eine lebenslang persistierende Infektion ohne offensichtliche Entzündungsreaktion und klinische Zeichen einer BD und wird auch als persistierende tolerante Infektion bezeichnet (Bautista *et al.*, 1994; Pletnikov *et al.*, 2002a).

Allerdings erfolgte in allen in der Literatur bisher beschriebenen Untersuchungen von immuninkompetenten neugeboren-infizierten Ratten die Infektion durch direkte intrazerebrale Injektion, die eine erhebliche Noxe für das betroffene Hirngewebe darstellt. Gleichzeitig ist davon auszugehen, dass die Deposition des Inokulats eine erhebliche lokale Schädigung des Gehirngewebes durch das Inokulationsvolumen verursacht und zu Gewebs- und Immunreaktionen führen kann.

Die neonatal intrazerebral infizierten (NBI-) Tiere zeigen keine offensichtlichen Zeichen einer Infektion, sind aber bedeutend kleiner als Kontrolltiere und zeigen Emotions- und Lerndefizite wie zum Beispiel mangelhaftes räumliches Lernen und Gedächtnis (Rubin *et al.*, 1999), abnormale soziale Interaktionen (Pletnikov *et al.*, 1998) sowie Anomalitäten in Physiologie und Neuroentwicklung wie zum Beispiel Hyperreaktivität auf neue Reize (Bautista *et al.*, 1994; Dittrich *et al.*, 1989; Hornig *et al.*, 1999; Pletnikov *et al.*, 1999b),

veränderte Schlaf-/Wach-Phasen und gesteigerten Appetit auf Salz. Wahrscheinlich entstehen diese Störungen aufgrund selektiver Schädigung spezifischer neuronaler Populationen (Bautista *et al.*, 1994; Hornig *et al.*, 2001; Pletnikov *et al.*, 2002a), bzw. durch die selektive Schädigung bestimmter Regionen im Gehirn, insbesondere in Neocortex, Hippocampus und Kleinhirn (Bautista *et al.*, 1995; Eisenman *et al.*, 1999; Gonzalez-Dunia *et al.*, 2000; Hornig *et al.*, 1999; Weissenböck *et al.*, 2000). Diese Regionen werden auch in neuropathologischen und MRI (Magnetic Resonance Imaging)- Studien in Zusammenhang mit Autismus gebracht (Gillberg, 1999; Lord *et al.*, 2000; Trottier, 1999).

Der Mechanismus der Wachstumshemmung bei NBI-Ratten ist noch unklar. Der Glukosespiegel und die Expression von Wachstumshormon und insulin-like growth factor-1 ist unverändert (Bautista *et al.*, 1994). Die Tiere haben verglichen mit Kontrolltieren eine normale Futteraufnahme, jedoch eine höhere relativ zur Körpergröße, was dafür spricht, dass die Wachstumshemmung von einem metabolischen Problem herrührt (Bautista *et al.*, 1995; Levitsky und Strupp, 1995). Unterernährung kann grundsätzlich Verhaltensstörungen auslösen (Levitsky und Strupp, 1995). Der Verdacht, dass die beobachteten Defizite bei NBI-Tieren möglicherweise eine Folge der Unterernährung sind und nicht primär durch das Virus verursacht werden, konnte nicht bestätigt werden, da die klinischen Störungen und die pathologischen Veränderungen in experimentell BDV-infizierten und experimentell unterernährten Ratten unterschiedlich waren (de la Torre, 2002; Dietz und Pletnikov, 2003).

Nach zwei Wochen p.i. kann virales Nukleoprotein im zerebralen und olfaktorischen Cortex und im Hippocampus detektiert werden. Purkinje Zellen (PCs) zeigen sich ab Tag 7 p.i. infiziert (Bautista *et al.*, 1995). Infiziert sind vor allem Neuronen, seltener Astrozyten, ependymale Zellen und Oligodendrozyten. Mit vier bis sechs Wochen sind die Proteine stärker verteilt und nehmen dann zwischen der 28. und 52. Woche allmählich ab (Weissenböck *et al.*, 2000). Pletnikov *et al.* (2002b) stellten einen Missklang zwischen Virusreplikation und Schwere der Verhaltensanormalitäten fest.

Die NBI-Tiere haben im Gegensatz zu den adult infizierten Ratten, bei denen BDV sich auf das zentrale und periphere Nervensystem beschränkt, detektierbares BDV in praktisch allen Geweben (Herzog *et al.*, 1984; Morales, 1988; Morales *et al.*, 1988). Dieser Unterschied kann durch die ausreichend lange Gabe neutralisierender Antikörper experimentell aufgehoben

werden. Die so behandelten Tiere hatten kein Antigen in organspezifischen Zellen der Peripherie, sondern nur assoziiert in Nervenfasern (Stitz *et al.*, 1998).

Über den Nachweis von infektiösem Virus in Körpersekreten wie Urin und Speichel wurde berichtet (Morales *et al.*, 1988; Nitzschke, 1963) und die persistent infizierten Tiere sind in der Lage, bei Kohabitation naive adulte Ratten anzustecken (Morales *et al.*, 1988; Sauder und Staeheli, 2003). Dabei führte ein kurzer Kontakt (Stunden) nicht zur Ansteckung, während eine Kohabitation von ein oder mehr Tagen in den meisten Fällen bei den naiven Tieren zu einem Krankheitsausbruch nach fünf bis sechs Wochen führte. Die Gabe von Urin der Trägersinnen direkt in die Nase von naiven Tieren, führte schon nach 24-30 Tagen zu ersten Krankheitserscheinungen (Sauder und Staeheli, 2003).

Die Infektion interferiert mit der Entwicklung von Arealen des ZNS, die noch postnatal reifen und ist assoziiert mit Kleinhirnhypoplasie, fortschreitender Degeneration des Gyrus dentatus (DG) und kortikaler Schrumpfung (Bautista *et al.*, 1995; Gonzalez-Dunia *et al.*, 2000; Hornig *et al.*, 1999). Gonzalez-Dunia *et al.* (2000) beschreiben speziell den Verlust von Neuronen mit einem Diameter größer als 100µm in 45 Tage alten NBI-Lewis-Ratten, was mit den Beobachtungen von Apoptose von Pyramidenzellen im Neocortex übereinstimmt (Hornig *et al.*, 1999).

Das Kleinhirn zeigt eine normale Entwicklung bis zum Ende der ersten postnatalen Woche (Bautista *et al.*, 1995). Mit 14 Tagen treten hier Anzeichen für verminderte Entwicklung, verkümmerte Größe und Blattbildung auf und das Kleinhirn ist zum Abschluss der ZNS-Entwicklung (postnataler Tag 21) deutlich kleiner als bei Kontrollen mit Verschmälerung der Molekular- und Körnerzellschicht (Bautista *et al.*, 1995; Hornig *et al.*, 2001; Pletnikov *et al.*, 2002a).

BDV infiziert Purkinje-Zellen (PCs) ab Tag sieben p.i., scheint aber die Granulozyten im Kleinhirn nicht zu infizieren (Bautista *et al.*, 1995). Obwohl die PCs die Infektion anfänglich überleben, gehen viele infizierte PCs zwischen Tag 27 und 75 p.i. verloren (Bautista *et al.*, 1995; Eisenman *et al.*, 1999; Zocher *et al.*, 2000).

Auch BDV-infizierte Neurone im DG werden fortschreitend zerstört (Hornig *et al.*, 1999; Rubin *et al.*, 1999; Sauder und de la Torre, 1999) und durch Gliazellen ersetzt (Carbone *et al.*,

1991; Hornig *et al.*, 1999; Zocher *et al.*, 2000). Eine Reduktion der DG-Neurone wurde ab der dritten Woche beobachtet.

Ebenso traten auch TUNEL-positive Zellen ab der dritten Woche auf, erreichten einen Höhepunkt nach vier Wochen und fielen danach ab. Außerdem wird eine Hochregulierung der Genexpression von den pro-apoptotischen FAS und Caspase-1 und eine Herunterregulierung der mRNA des anti-apoptotischen bcl-x beschrieben (Weissenböck *et al.*, 2000; Zocher *et al.*, 2000).

Deutliche Mikroglie und moderate Astroglie erscheinen in allen Hirnregionen nach vier Wochen p.i. und sind präsent bis mindestens zur 52. Woche p.i. (Weissenböck *et al.*, 2000).

Bautista *et al.* (1995) und Carbone *et al.* (1991) beschreiben diffuse reaktive Astrozytose mit Glie schon ab dem dritten Tag nach intrazerebraler Infektion.

Aktivierte Mikroglia oder reaktive Astrozyten sind auch eine wahrscheinliche Quelle für die hochregulierte Genexpression proinflammatorischer Cytokine (Benveniste, 1997).

Mit 4 Wochen p.i. wurde mononukleäre Inflammation in den Leptomeningen, perivaskulären Zwischenräumen und im Neuropil beobachtet (Weissenböck *et al.*, 2000), die Mehrzahl davon waren T-Zellen (nicht-BDV-spezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen in ungefähr gleichem Verhältnis), weniger NK-Zellen, Monozyten/Makrophagen und B-Zellen (Hornig *et al.*, 1999; Weissenböck *et al.*, 2000). Das transiente Auftreten von inflammatorischen Infiltraten war reproduzierbar und fiel mit dem Höhepunkt der neuronalen Apoptose zusammen. Aufgrund der Verteilung dieser Zellen ist es dennoch unwahrscheinlich, dass infiltrierende Zellen eine wesentliche Rolle in der Neuropathogenese spielen (Weissenböck *et al.*, 2000). Außerdem zeigen neonatal thymektomierte und infizierte Ratten ohne Inflammation ein ähnliches Muster der Apoptose (Hornig und Stitz, unveröffentlicht; Weissenböck *et al.*, 2000).

Ebenfalls ab der vierten Woche p.i. wird MHC-I verglichen mit gesunden Kontrolltieren in höherem Grad in endothelialen Zellen, Mikrogliazellen und wenigen Astrozyten und Neuronen detektiert mit einem Höhepunkt zwischen der vierten und sechsten Woche p.i., gefolgt von einem Rückgang der MHC I-Expression. MHC-II ist in NBI-Ratten ebenfalls ab der vierten Woche p.i. erhöht und zusätzlich auf Mikroglia und Entzündungszellen zu finden (Weissenböck *et al.*, 2000). Ab der vierten Woche p.i. zeigten NBI-Ratten eine deutlich erhöhte CD4-Expression auf der Mehrzahl der aktivierten Mikroglia sowie OX-8-positive aktivierte Mikroglia (Weissenböck *et al.*, 2000).

Chronische Hochregulierung von den proinflammatorischen Cytokinen IL-1 $\alpha$  und  $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  wird im ZNS von NBI-Ratten beobachtet (Hornig *et al.*, 1999; Plata-Slaman *et al.*, 1999; Sauder und de la Torre, 1999), ebenso Veränderungen der Menge von detektierbarem Serotonin, Norepinephrin, Dopamin-2-Rezeptoren und HT (Hydroxytryptamin)-Rezeptoren, wobei Unterschiede in der Ausprägung zwischen Lewis- und Fisher-Ratten bestehen (Pletnikov *et al.*, 2002c).

Antivirale Antikörper werden in NBI-Ratten gefunden, aber diese zeigten keine neutralisierende Aktivität (Stitz *et al.*, 1998).

Das Spektrum der Änderungen in Verhalten und Neuroentwicklung bei NBI-Ratten hat bemerkenswerte Parallelen mit einigen der Hauptmerkmale von menschlichen neuropsychiatrischen Störungen. Dysgenese in Kleinhirn und Hippocampus (Carbone *et al.*, 1991; Narayan *et al.*, 1983a) ähneln den Störungen der Neuroentwicklung wie sie unter anderem bei Schizophrenie (Altshuler *et al.*, 1987; Fish *et al.*, 1992) und affektiven Krankheiten (Soares und Mann, 1997) beschrieben sind.

Insbesondere stellen neonatal infizierte Lewis Ratten ein einzigartiges Modell für Autismus dar (Kemper und Bauman, 1993). Sie zeigen klare Verhaltensdefizite ähnlich einigen Kernmerkmalen von „autism spectrum disorders“ (ASD) (Gillberg, 1999; Lord *et al.*, 2000; Rapin und Katzman, 1998). Die BDV-induzierten Defizite zeigen starke Korrelation mit den Anomalitäten, die bei Kindern mit ASD vorkommen, einschließlich neuronaler Zellverlust in Kleinhirn und Hippocampus, Anomalitäten im Serotonin- und Norepinephrin-Neurotransmitter-System und sozialem, emotionalem und kognitivem Verhalten (Bautista *et al.*, 1994 und 1995; Plata-Salaman *et al.*, 1999; Pletnikov *et al.*, 1999a, 1999b und 2000; Rubin *et al.*, 1999; Trottier *et al.*, 1999; Tsai, 1999).

Adult BDV-infizierte Ratten, die medikamentös immunsupprimiert (Dexamethason-Behandlung) wurden, zeigen wie die immuninkompetenten neugeboren-infizierten Tiere weniger Klinik, Infiltrate und Entzündungszeichen als adult-infizierte Tiere ohne immunsupprimierende Behandlung, mehr BDV-RNA und die Cytokine TNF- $\alpha$ , MIF-1 $\beta$ , IL-6 und mob-1 sind hochreguliert. Es besteht der Verdacht, dass diese Cytokine durch einen direkten BDV-abhängigen Mechanismus hochreguliert werden und dass sie in ZNS-residenten Zellen

exprimiert werden (Morimoto *et al.*, 1996).

#### 2.2.5.2 Das Mausmodell

Die Infektion der Maus hat als Modell den Vorteil, leicht zugänglich für genetische Manipulationen zu sein. So stehen eine Reihe verschiedener transgener und knock-out-Mäuse zur Verfügung. Beispielsweise konnte mit Hilfe von transgenen Mäusen die Rolle von IFN in vivo studiert werden, nachdem es in der Zellkultur einen hemmenden Effekt auf die BDV-Replikation gezeigt hatte (Hallensleben und Staeheli, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass transgen exprimiertes IFN- $\alpha$  die Verbreitung von BDV im Gehirn potent inhibiert. Jedoch ist das IFN- $\alpha/\beta$ -System normalerweise in vivo nicht sehr effektiv, wahrscheinlich weil die natürliche BDV-induzierte IFN-Antwort zu schwach ist oder zu spät auftritt, um die Virusausbreitung einzuschränken. Außerdem kann IFN- $\alpha/\beta$  die Balance zwischen Transkription und Replikation des viralen Genoms verändern (Staeheli *et al.*, 2001).

Mäuse sind leicht infizierbar und haben hohe Virustiter im Gehirn (Kao *et al.*, 1984). Bis vor kurzem nahm man an, dass Mäuse relativ resistent gegen die Krankheit sind und persistent infizierte Mäuse kaum detektierbare klinische Symptome entwickeln (Kao *et al.*, 1984; Rubin *et al.*, 1993), jedoch zeigten Studien, dass die BD durch die Adaption des Virus durch mehrere Passagen in Mäusen (Rubin *et al.*, 1993) oder Infektion von spezifischen Wirtslinien (MRL-Mäuse) während der postnatalen Phase (Hallensleben *et al.*, 1998) induziert werden kann. Dabei bilden sowohl krankheitsresistente als auch empfängliche Tiere Antikörper gegen BDV-Protein im Blut (Cserr und Knopf, 1992; Hallensleben *et al.*, 1998).

Infizierte Mäuse können nach intrazerebraler Infektion eine schwere Meningoenzephalitis oder eine symptomlose persistierende Infektion entwickeln, abhängig vom Virusstamm und dem Alter der Tiere zum Infektionszeitpunkt. MRL-Mäuse zeigen hohe Empfänglichkeit und entwickeln eine virusinduzierte neurologische Krankheit, während B10.BR oder F1-Mäuse meist trotz persistierender Virusinfektion des ZNS und virusspezifischer, aber nicht aktivierter T-Zellen gesund bleiben (Hallensleben *et al.*, 1998; Hausmann *et al.*, 1999). Dies wird als immunologische Ignoranz bezeichnet und definiert als ein Stadium, während dem potentiell reaktive T-Zellen trotz im Organismus vorhandenem Antigen nicht aktiviert sind (Hausmann *et al.*, 1999).

Die meisten neonatal (innerhalb der ersten 24 Stunden) intrazerebral infizierten MRL-Mäuse zeigen schwere neurologische Symptome und eine schwere lymphozytische Meningoenzephalitis mit reduzierter Neuronenzahl und können schon früh an einer unphysiologischen Stellung der Hinterbeine identifiziert werden (Hallensleben *et al.*, 1998). Die Krankheit schreitet rasch mit einer Verminderung des Körpergewichts um mehr als 20% innerhalb von vier Tagen fort. Einige Tiere sterben, andere erholen sich von der akuten Phase. Der Anteil an erkrankten Tieren, die die oben beschriebene BD entwickeln, variiert stark innerhalb der verschiedenen Mauslinien (Hallensleben *et al.*, 1998). Das Auftreten von starken perivaskulären und parenchymalen lymphozytischen Infiltraten korreliert mit dem Ausbruch der Krankheitssymptome, gewöhnlich zwischen drei und sechs Wochen p.i. (Hallensleben *et al.*, 1998).

Keine oder nur geringe Virusmengen konnten im Gehirn in den ersten 15 Tagen gefunden werden, während BDV-RNA leicht ab Tag 20 detektiert werden konnte, nach etwa vier Wochen ein Plateau erreichte und auf diesem Niveau für mindestens 12 Monate blieb. Dabei bestand in den meisten Fällen eine inverse Korrelation zwischen der Präsenz von hohen Virusmengen (RNA) und neurologischen Symptomen (Hallensleben *et al.*, 1998).

Astrozyten im Gehirn der NBI-Mäuse sind zwar geschwollen, aber diese Astroglieose ist nicht von einer erhöhten GFAP-Immunreaktivität begleitet (Hallensleben, 1998).

Wie bei Ratten ist die Krankheit durch MHC-I-abhängige zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die die Hilfe der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen-Subpopulation benötigen, vermittelt (Hallensleben *et al.*, Hausmann *et al.*, 1999 und 2005a). Obwohl die Perforin-vermittelte Lyse von Zielzellen als der antivirale Haupteffektormechanismus von CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten gilt (Kagi *et al.*, 1994; Smyth und Trapani, 1998; Trapani *et al.*, 1999; van der Broeck und Hengartner, 2000), sprachen Experimente mit Perforin-defizienten Mäusen dagegen, dass das pathogenetische Potential von CD8<sup>+</sup>-Zellen bei BD primär in ihrer lytischen Aktivität liegt (Hausmann *et al.*, 2001). Mauslinien, die keine funktionsfähigen CD8<sup>+</sup>-Zellen generieren, entwickeln eine persistente Infektion ohne Neuronenverlust, aber mit Lerndefiziten ähnlich wie bei NBI-Ratten (Sauder *et al.*, 2001).

Das BDV-N-Protein scheint dabei das Hauptziel der CD8-Immunantwort im ZNS der Maus zu sein. Für die Ratte war bereits 1999 gezeigt worden, dass das Nukleoprotein die Zielterminante für zytotoxische T-Zellen darstellt (Planz und Stitz, 1999). Das entsprechende virusspezifische Peptid konnte ebenfalls identifiziert werden (Planz *et al.*, 2001). Schamel *et*

*al.* (2001) identifizierten für die Maus das hochkonservierte Peptid TELEISSI auf dem BDV-p40 als ein potentes zytotoxisches T-Zell-Epitop in BDV-anfälligen Mausstämmen (H-2k-Allel-assoziiert). In Experimenten mit Mäusen, die BDV-N in Astrozyten oder Neuronen exprimieren, zeigten sich allerdings keine Symptome oder Störungen, was dafür spricht, dass BDV-N allein nicht toxisch ist. Jedoch schienen diese Tiere eine immunologische Toleranz gegen diese Genprodukte zu entwickeln, da die N-spezifische CD8-Immunantwort bei späterer Infektion schwer gestört war (Rauer *et al.*, 2004). Transgene Mäuse, die das Phosphoprotein P in Gliazellen exprimieren, entwickeln dagegen Verhaltens- und neurobiologische Störungen ähnlich denen in BDV-infizierten Mäusen, aber keine neurodegenerativen Veränderungen (Kamitani *et al.*, 2003).

Über vertikale Transmission in Mäusen wurde berichtet. Sechs Wochen alte Mäuse wurden infiziert und zur Zucht verwendet. Keine der Mütter zeigte Klinik oder histopathologische Veränderungen im Untersuchungszeitraum. Bei den Feten, sieben Tage alten Welpen und in den Plazenten wurde BDV-RNA nachgewiesen (Okamoto *et al.*, 2003).

### **2.2.5.3 Experimentelle Infektion des Gerbils**

Experimentell neonatal infizierte Gerbale sind hoch empfänglich für BDV. Sie haben trotz akuter fataler neurologischer Störungen und starker Proliferation von BDV keine schweren neuroanatomischen Veränderungen wie Astrozytose, neuronale Degeneration und Neuronenverlust im Gehirn (Nakaruma *et al.*, 1999b und 2000; Watanabe *et al.*, 2001).

Fast alle Gerbale, die am postnatalen Tag 1, bzw. 7 infiziert wurden, wiesen große Virusmengen im Gehirn auf und starben an Tag 30, bzw. 78 p.i., während solche, die an Lebenstag 14 infiziert wurden, keine neurologischen Störungen zeigten (Lee *et al.*, 2003)

Nakaruma *et al.* (1999b) fanden Infiltrate in Bulbus olfactorius und Cortex und neuronale Degeneration im Bulbus olfactorius in NBI-Gerbilen an Tag 20 p.i. während bei NBI-Ratten keine Entzündungszeichen zu finden waren. BDV-mRNA findet sich zu Beginn der Infektion vor allem in Cortex, Hippocampus, Diencephalon und Kleinhirnmarch, nach Auftreten der Symptome vor allem im unteren Hirnstamm und Kleinhirn (Watanabe *et al.*, 2001).

Während Antikörper gegen p10 und P (p24) im Blut regelmäßig zu finden sind, ist eine Antwort gegen N (p40) sowohl in adult wie auch in neugeborenen infizierten Gerbilen schwach



oder gar nicht ausgeprägt (Watanabe *et al.*, 2001), was zu den fehlenden oder nur minimal ausgeprägten Entzündungsreaktionen passt, da frühere Studien zeigten, dass in Ratten eine Immunantwort gegen p40 für die Induktion einer Enzephalitis nötig ist (Planz und Stitz, 1999). Sowohl mit Cyclosporin A behandelte als auch unbehandelte Gerbale bekamen schwere Symptome um Tag 22 p.i. und starben um Tag 30, aber Apoptose (TUNEL-Methode) wurde nicht detektiert. Im Unterschied zu der Infektion der Ratte gab es keinen Verlust von Purkinje Zellen, die bei Gerbils bemerkenswerterweise auch erst im gereiften Kleinhirn, also ab der dritten Woche p.i. infiziert werden. Während die Behandlung mit Cyclosporin A keinen Einfluss auf die Virusreplikation hatte, war ein Unterschied in der Cytokinexpression zu erkennen: Hier waren bei unbehandelten IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  deutlich erhöht, bei behandelten IL-1  $\alpha$  und IFN- $\gamma$  erniedrigt (Watanabe *et al.*, 2003).

### 2.2.6 Mensch

Neben der Ähnlichkeit der Anomalitäten in experimentell infizierten Versuchstieren zu denen bei einigen neuropsychiatrischen Krankheiten des Menschen, führte die Detektion von viraler RNA und Antikörpern gegen BDV-Proteine in peripheren mononukleären Blutzellen von psychiatrischen Patienten zu der Annahme, dass BDV im Zusammenhang mit menschlichen neuropsychiatrischen Krankheiten steht.

Der erste Bericht über die Detektion von BDV-Antikörpern in Menschen erschien 1985 bei Patienten mit Depression und psychiatrischen Störungen (Amsterdam *et al.*, 1985). Über den Nachweis von BDV-Antigen in Populationen peripherer mononukleärer Blutmonozyten von hospitalisierten psychiatrischen Patienten wurde erstmals 1994 berichtet (Bode *et al.*, 1994).

Jedoch ist es schwierig, bestimmte Risikogruppen zu identifizieren, da keine einzelne psychiatrische Störung mit BDV assoziiert wird, sondern viele verschiedene Krankheiten in Zusammenhang mit dem Virus gebracht werden. Ob der Mensch sich mit BDV infizieren kann und ob ein kausaler Zusammenhang zwischen der Infektion und psychiatrischen Störungen besteht, wird immer noch sehr kontrovers diskutiert.

Chalmers *et al.* (2005) werteten 44 Studien zur Prävalenz beim Menschen aus verschiedenen Ländern wie den USA, Deutschland, Österreich, Japan, Taiwan, Thailand und Israel aus und

fanden große Unterschiede zwischen den Resultaten der verschiedenen Studien. Die untersuchten Menschen bestanden in den meisten Berichten jeweils aus einer bestimmten Patientengruppe und einer oft schlecht beschriebenen und fraglichen Kontrollgruppe. Seroprävalenz (Aussage über Exposition zu BDV) und Prävalenz (Aussage über momentane Infektion) variierten zwischen 0% und 48% in einer einzelnen Studie von HIV-Patienten in Thailand. Die höchste Virusprävalenz war 82% in elf Gehirnen von schizophrenen Patienten. Schwemmle und Billich (2004) geben in ihrer Übersicht eine Seroprävalenz von 0,6-45% bei Patienten und 0-3,5% bei gesunden Kontrollen an (Jordan und Lipkin, 2001; Schwemmle, 2001).

In den Prävalenzstudien wurde verschiedenes Ausgangsmaterial (Plasma, Zerebrospinalflüssigkeit, Hirngewebe und andere) und verschiedene Methoden (IFA, Western Blot, ELISA, PCR, RT-PCR und andere) verwendet und die untersuchten Gruppen wurden nach unterschiedlichen Kriterien in unterschiedlichen geographischen Gebieten ausgewählt, so dass wie auch bei den Prävalenzstudien bei Pferd, Katze und anderen Tieren die Vergleichbarkeit der Studien fraglich ist.

Die beim Menschen gefundenen BDV-Antikörper haben eine niedrige Avidität zum Antigen (Allmang *et al.*, 2001). Dies ist typisch für kreuzreagierende Antikörper und für Antikörper, die in einer frühen Infektionsphase gebildet werden. Da es beim Menschen bei Langzeitstudien von ein bis vier Jahren nicht zu einer Maturation der Antikörper zu solchen mit hoher Avidität kam (Allmang *et al.*, 2001) und beim Pferd und Schaf die Antikörper mit hoher Avidität an das BDV-Antigen binden (Billich, 2002; Allmang *et al.*, 2001), war eine Kreuzreaktivität naheliegend, was das zoonotische Potential von BDV in Frage stellte. Jedoch konnten Billich *et al.* (2002) mit Hilfe eines Peptide-array-based Screening-Test zur weiteren Identifizierung der Antikörper widerlegen, dass es sich um Antikörper handelt, die gegen ein anderes Pathogen gerichtet sind.

ECLIA- und Western Blot-Analysen mit rekombinanten Formen der zwei viralen Hauptproteine N und P ergaben, dass die Reaktivität von humanen Antikörpern oft nur gegen eines der beiden Proteine gerichtet sind, anders als in natürlich infizierten Pferden, bei denen normalerweise Antikörper gegen beide Proteine nachgewiesen werden können (Fukuda *et al.*, 2001; Waltrip *et al.*, 1995; Yamaguchi *et al.*, 1999).

Auch wird immer wieder kritisiert, dass PCR-positive Ergebnisse Folge einer Labor-Kontamination sein können (Schwemmle *et al.*, 1999; Bode *et al.*, 2000). Auf der anderen

Seite wurden neue Isolate gefunden, die sich mit den bekannten Markern nicht darstellen lassen, und die Variation und Verbreitung von BDV könnte größer sein als bisher angenommen wurde (Nowotny und Kolodziejek, 2000).

Die neue Entdeckung von zirkulierenden Immunkomplexen (CICs) und Antigen (N und P) im Plasma als charakteristische Marker für aktivierte BDV-Infektionsstadien (Bode *et al.*, 2001) könnte eine neue Richtung in klinischer Forschung von BDV-Infektionen beim Menschen sein und gibt Zukunftsmöglichkeiten für epidemiologische Studien. Eine Untersuchung von je 3000 Seren von Menschen und Pferden über vier Jahre mit neuen Enzym-Immunassays (EIAs) ergab, dass BDV-CICs eine zehnmal höhere Infektionsrate als vorherige Serologiestudien anzeigen (Rott *et al.*, 1985; Bode, 1995). Das Vorhandensein dieser CICs könnte auch eine mögliche Erklärung für den von Zimmerman *et al.* (1994) berichteten Mangel an Persistenz von BDV-Antikörper bei natürlichen Infektionen sein, da CICs mit freien Antikörper und Antigen interagieren.

Ein diagnostischer Goldstandard-Test fehlt bisher genauso wie langfristige Studien, um mehr über eine serologische Antwort und den klinischen Verlauf von seropositiven Patienten herauszufinden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Tiere

Bei den Tieren handelt es sich um Lewis Ratten aus der Versuchstierzucht des Friedrich-Loeffler-Instituts des Bundesforschungsinstituts für Tiergesundheit in Tübingen.

##### 3.1.2 Virus

Zur Infektion der Ratten wurde die 5. Rattengehirn Passage des BDV-Strang He/80 verwendet (Planz *et al.*, 2003).

##### 3.1.3 Antikörper und Seren

<u>Primärantikörper gegen:</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Verdünnung</u>
- BDV p38	Mouse-anti-BDV p38 protein	1:500
- CD8	Serotec MCA48R, mouse anti rat CD8 Alpha, clone Number MRC OX8	1:100
- CD45	Serotec MCA53R, mouse anti rat CD45RC, clone Number MRC OX-22	1:200
- CD68	Serotec MCA341R, mouse anti rat CD68, clone Number ED-1	1:100
- GFAP	Dako Cytomation Z0334, polyclonal rabbit anti-Glial Fibrillary Acidic Protein	1:3000
- NF	Monosan MON 3004, Human Neurofilament, clone 2F11	1:50
- Vimentin	Bio genex AM074-10M, mono clonal mouse anti Vimentin, clone V9	1:100

Sekundärantikörper:

- horse-anti-mouse	biotinylated anti-mouse IgG (H+L), rat absorbed, affinity purified, made in horse, Vector BA-2001	1:50
--------------------	---	------

Normalserum:

- normal horse serum	normal horse serum, Vector, S 1966	1:100
----------------------	------------------------------------	-------

**3.1.4 Chemikalien, Lösungen, Puffer*****3.1.4.1 Chemikalien und Lösungen für Standardfärbungen***

## 1. Hämalan:

Mayers Hämalanlösung, MERCK 9249

## 2. Eosin:

Eosin G 1%, Cerstistain<sup>®</sup>, MERCK 15935

## 3. KV-Lösung:

1 g Kresylviolett (Merck 5235) und 2 ml 20%-iger Essigsäure in 100 ml Aqua dest.  
(B. Braun) gelöst. Die Lösung wird kurz vor Gebrauch filtriert.

***3.1.4.2 Chemikalien und Lösungen für immunhistochemische Färbungen***

Es wurde soweit nicht anders angegeben die gleiche Zusammensetzung der Lösungen bei allen immunhistochemischen Färbungen verwendet.

1. PBS-Puffer (modifiziert nach Wood und Warnke, 1981) :

70,13 g Na Cl (Merck 6404)

13,80 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Merck 6346)

54,40 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Merck 5104)

48 ml NaOH 1N (Merck 9956)

auf 10 l Aqua dest. (B. Braun) aufgefüllt und ggf. mit 1-normaler NaOH auf einen pH von 7,6 eingestellt

2. PBSA-Puffer:

Albumin (bovine, fraction V, Sigma A-3294), 1%ig in PBS-Puffer

3. Tween-Puffer:

1,5 ml Tween<sup>®</sup> (Dako Tween<sup>®</sup> 20, S 1966) in 1 l PBS-Puffer

4. Hämalaun:

1 g Hämatoxylin (Merck 4302)

0,2 g Na-Jodat (Merck 6525)

50 g Al-K-Sulfat (Merck 1047)

50 g Chloralhydrat (Merck 2811)

1 g Citronensäure (Merck 244)

auf 1 l Aqua dest. (B. Braun) aufgefüllt, vor Gebrauch mindestens eine Woche stehen lassen

5. Citratpuffer:

Dako Cytomation Target Retrieval Solution 10x Concentrate S 1699, 1:10 in Aqua dest. gelöst und auf pH 6 eingestellt

6. Auf-/absteigende Alkoholreihe:

- 70 %iger Alkohol (Ethanol 70 % (V/V) mit 1 % Petroläther vergällt)
- 96 %iger Alkohol (Ethanol 96 % (V/V) mit 1 % Petroläther vergällt)
- 100 %iger Alkohol (Ethanol 99,5 % (V/V) mit 1 % Petroläther vergällt)
- Xylol (Merck 8685)

7. ABC (Avidin-Biotin-Komplex):

Kurz vor Gebrauch Ansetzen der Gebrauchslösung. Mischung der Lösungen  
A:B:PBS-Puffer im Verhältnis 1:1:50 des Reaktionskits Vector Vectastain ABC Kit  
PK-4000

8. DAB (3,3'-Diaminobenzidin):

Kurz vor Gebrauch Ansetzen der Gebrauchslösung. Mischen der Lösungen Substrate  
Buffer : DAB+Chromogen (X50) im Verhältnis 50:1 (Dako K 5007); bis zur  
Verwendung gekühlt und lichtgeschützt aufbewahren

9. 1 %-iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Methanol:

10 ml 30 %iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck 7200) in 290 ml Methanol (Merck 6009) zum Blocken  
der endogenen Peroxidase

10. UltraTek Kit:

Lösung 1: Sky Tek Laboratories ABN 999, UltraTek Anti-Polyvalent Biotinylated  
Antibody

Lösung 2: Sky Tek Laboratories ABN 999, UltraTek HRP

11. 1 %-ige Pronase-Lösung:

Merck 7433 Pronase E (aus *Streptomyces griseus*) 0,1 g in 100 ml PBS gelöst

### **3.2 Methoden**

#### **3.2.1 Infektion**

Die Infektion der untersuchten Tiere erfolgte über die aerogene Route. Hierfür wurden die Ratten innerhalb der ersten 18 Stunden nach der Geburt dem Aerosol einer virushaltigen Gehirnsuspension in einer Begasungskammer ausgesetzt. Die in *Tabelle 1* angegebene Virusdosis wurde mit 10%iger Hirnsuspension auf 1,5-2 ml aufgefüllt. Für die Generierung der Aerosole wurde der Nebulizer der Firma Pari verwendet, der Aerosole mit einer Partikelgröße erzeugt, die optimal für die Deposition in den unteren und oberen Atemwegen ist (100% der Partikel kleiner als 10 µm im Durchmesser, 60% kleiner als 2,5 µm im Durchmesser und 52% kleiner als 1,2 µm im Durchmesser).

Die neugeborenen-infizierten Tiere sowie ggf. Sentinels (nicht-infizierte Tiere) blieben nach erfolgter Infektion bis zur Geschlechtsreife mit ihren Wurfgeschwistern bei der Mutter, danach wurden sie nach Geschlechtern getrennt gehalten.

#### **3.2.2 Gewebsentnahme und Präparation**

Die Tiere wurden in tiefer Narkose durch Exartikulation des Atlantookzipitalgelenks getötet. Nach Absetzen des Kopfes wurde das Gehirn dem Schädel entnommen und in 4 %iges Formaldehyd überführt.

#### **3.2.3 Einbetten**

Die in 4%igem Formaldehyd konservierten Gehirne wurden mit einer Skalpellschneide in der Medianen geteilt und jeweils eine circa 3 mm dicke Scheibe von median nach lateral der rechten Gehirnhälfte wurde in eine Kunststoff-Einbettungskapsel verbracht. Die Entwässerung und Durchtränkung des Gewebes mit flüssigem Paraffin (Merck, Paraffinpastillen, Erstarrungspunkt etwa 56°-58°C für Histologie) erfolgte maschinell mit dem Autotechnicon Shandon Citadel 1000.



Das Ausgießen der Präparate wurde manuell am Shandon Histocentre 2 vorgenommen, so dass die Mediane der Gehirnscheiben auf den entstandenen ausgehärteten Paraffin-Blöcken oben, also auf der Schnittfläche zu liegen kam. So entstanden Längsschnitte der rechten Gehirnhälfte von median nach lateral.

Die erstellten Paraffin-Blöcke wurden bei Raumtemperatur (RT) gelagert und einige Stunden vor dem Schneiden bei 4°C gekühlt.

### 3.2.4 Paraffinschnitte

Von den bei 4°C gekühlten Paraffin-Blöcken wurden mit dem Reichert-Jung Histoslide 2000 je Block circa 30 2µm starke Schnitte gefertigt und auf ein Wasserbad (Aqua dest., RT) verbracht. Anschließend wurden diese zum Strecken der Schnitte einige Sekunden auf ein 47°C warmes Wasserbad (Aqua dest.) gelegt und von diesem auf spezielle Objektträger (OTs) (Menzel-Gäser, SuperFrost® Plus, J 1800 AMNZ) aufgezogen. Die OTs wurden dann über Nacht in einem Wärmeschrank bei circa 51°C getrocknet und bis zur weiteren Verwendung in staubgeschützten Kästen bei RT gelagert.

### 3.2.5 Entparaffinieren

Das Entparaffinieren der angefertigten Schnitte wurde bei allen Standardfärbungen und immunhistochemischen Methoden vor der weiteren Bearbeitung in gleicher Weise vorgenommen.

Durchführung bei RT:

- |  |            |
|--|------------|
| 1. Xylol   | 12-15 min  |
| 2. 100 %iger Alkohol (99,5% (V/V) mit 1% Petroläther vergällt) | ca.10 sec  |
| 3. OTs trocknen lassen   | ca. 5 min  |
| 4. 96%iger Alkohol (96% (V/V) mit 1% Petroläther vergällt)     | ca. 10 sec |
| 5. 70%iger Alkohol (70% (V/V) mit 1% Petroläther vergällt)     | ca. 10 sec |

## 6. Aqua dest. bis zur weiteren Behandlung

### 3.2.6 Standardfärbungen

Standardfärbungen ermöglichen eine Übersicht über das zu untersuchende Gewebe und geben Hinweise auf pathologische Veränderungen. So können entzündliche Infiltrate, Blutungen, Veränderungen der Zelldichte und einige morphologische Veränderungen bestimmter Zellarten erkannt werden. Außerdem kann anhand bestimmter anatomischer Strukturen insbesondere der Form und Ausbreitung der Ventrikel die Schnittebene ungefähr bestimmt werden.

Die Standardfärbungen Hämatoxylin-Eosin (HE) und Kresyl-Violett (Nissl, KV) wurden bei den Gewebeproben aller Tiere durchgeführt.

#### 3.2.6.1 *Hämatoxylin-Eosin-Färbung*

Der Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Schnitt bietet die einfachste und schnellste Möglichkeit zur Beurteilung des Hirngewebes. Zellkerne erscheinen blauviolett durch Affinität ihres negativ geladenen Nukleinsäurematerials zum basischen blauen Farbstoff Hämatoxylin. Zytoplasma und Neuropil färben sich durch den Farbstoff Eosin rosa.

Durchführung aller Färbeschritte nach dem Entparaffinieren bei RT:

- |  |       |
|--|-------|
| 1. Häkalaun  | 5 min |
| 2. Bläuen in Leitungswasser  | 4 min |
| 3. 1 %iges Eosin   | 1 min |
| 4. Mehrfach spülen in Leitungswasser   |       |
| 5. Aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 %, reiner Ethanol, s.a. Entparaffinieren) je ca. 10 sec |       |
| 6. Xylol   | 2 min |
| 7. Eindecken   |       |

### 3.2.6.2 Kresyl-Violett-Färbung (KV, Nissl-Färbung)

Die Nissl-Färbung wird vor allem zur Beurteilung der Nervenzellen und zur Einschätzung der Zelldichte verwendet. Hierbei färben sich Zellkerne dunkelblau und die im Zytoplasma der Nervenzellen vorkommenden Nissl-Schollen (auch Tigroidschollen) blau oder blauviolett. Das Zytoplasma von Gliazellen zeigt sich blassblau, während Zellfortsätze ungefärbt bleiben.

Durchführung aller Färbeschritte nach Entparaffinieren bei RT:

- |  |       |
|--|-------|
| 1. KV-Lösung   | 5 min |
| 2. Spülen in Aqua dest.  |       |
| 3. 96 %iges Ethanol mit 1-2 Tropfen Eisessig versetzt  | 1 min |
| 4. Aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 %, reiner Ethanol, s.a. Entparaffinieren) je ca. 10 sec |       |
| 5. Xylol   | 2 min |
| 6. Eindecken   |       |

### 3.2.7 Immunhistochemische Färbungen

Immunhistochemische Färbungen dienen dem qualitativen und quantitativen Nachweis von bestimmten Proteinen und Zellen und der Bestimmung ihrer Verteilung und Lokalisation im Gewebe.

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten nach institutsinternem Färbeschema. Die geeignete Verdünnung war vorher in Verdünnungsreihen (ggf. orientiert nach den Angaben des Herstellers) ermittelt worden. Die Verdünnungsstufe wurde gewählt, welche größtmögliche spezifische Färbeintensität bei kleinstmöglicher Hintergrundfärbung lieferte. Da bei den verschiedenen Antikörpern (Ak) eine unterschiedliche, bzw. keine besondere Vorbehandlung der Gewebeschnitte notwendig ist, werden die Protokolle hier getrennt aufgeführt.

Zum Bedecken der OTs zum Schutz vor Austrocknung wurde bei einigen Schritten Parafilm (Parafilm „M“<sup>®</sup>, Pechiney Plastic Packing, PM-996) verwendet.

### 3.2.7.1 *Darstellung von Gehirnzellen*

Zur Darstellung bestimmter Gehirnzellen kann der immunhistochemische Nachweis spezifischer Intermediärfilamente dienen. Dabei handelt es sich um Zellkomponenten aus faserigen Polypeptiden mit einem Durchmesser von etwa 8-10 nm. Die genaue biologische Bedeutung ist nicht bekannt, jedoch werden sie als wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts angesehen. Die verschiedenen Intermediärfilamente sind mehr oder weniger spezifisch für bestimmte Zellen oder Zellgruppen oder einem bestimmten Reifegrad einer Zellart und werden zur Typisierung dieser herangezogen. Auch kann der Grad der Expression in manchen Fällen Hinweise auf pathologische Vorgänge geben.

#### 3.2.7.1.1 *Astrozyten*

Das fibrilläre saure Gliaprotein (GFAP) ist ein 50 kDa großes intrazytoplasmatisches filamentöses Protein, welches einen Anteil des Zytoskeletts in Astrozyten bildet (Bignami *et al.*, 1972; Ludwin *et al.*, 1976; Uyeda *et al.*, 1972) und gilt als spezifischer Marker für Zellen mit astrozytischer Herkunft.

Bei krankhaften Prozessen im Gehirn, wie Traumata, Infektionen oder Vergiftungen, reagieren Astrozyten sehr schnell mit Proliferation und zeigen eine extensive Hypertrophie des Zellkörpers und der Prozesse, GFAP ist deutlich hochreguliert.

Zum Nachweis des GFAP wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet und das UltraTek Ready-To-Use-Kit.

Durchführung der Immunhistochemie bei RT (soweit nicht anders angegeben):

1. Entparaffinieren
2. Zwischen dem Trocknen nach dem 100 %-igem und dem 96 %-igem Alkohol Blocken der endogenen Peroxidase in 1 %-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Methanol 25 min
3. Vom Aqua dest. in Tween-Puffer, mehrmals spülen

- 
- |     |  |                    |
|-----|--|--------------------|
| 4.  | OTs mit ca. 100 µl Primär-Ak-Lösung (rabbit anti-GFAP, 1:3000 mit PBSA verdünnt) pro OT beschichten, mit Parafilm bedecken und in eine feuchte Kammer verbringen | 40-50 min          |
| 5.  | Mehrere Male mit Tween-Puffer spülen   |                    |
| 6.  | Mit ca. 300 µl UltraTek Lösung 1 pro OT beschichten und in eine feuchte Kammer verbringen  | 15 min             |
| 7.  | Mehrere Male mit Tween-Puffer spülen   |                    |
| 8.  | Mit ca. 300 µl UltraTek Lösung 2 pro OT beschichten und in eine feuchte Kammer verbringen  | 15 min             |
| 9.  | Mehrere Male mit Tween-Puffer spülen   |                    |
| 10. | Mit ca. 300 µl frisch angesetzter DAB-Lösung pro OT beschichten, Dauer je nach Intensität der sichtbaren Braunfärbung  | 1-20 min           |
| 11. | Stoppen der Färbereaktion durch Spülen mit Aqua dest.  |                    |
| 12. | Gegenfärbung mit Hämalun   | 4 min              |
| 13. | Bläuen in Leitungswasser   | 3-5 min            |
| 14. | Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe  | jeweils ca. 20 sec |
| 15. | Eindecken  |                    |

#### 3.2.7.1.2 Unreife und reaktive Astrozyten

Vimentin bildet das Zytoskelett von mesenchymalen Zellen einschließlich Fibroblasten, Chondrozyten, Osteozyten, Endothelien und weißen Blutkörperchen (Franke und Moll, 1987). Auch wird es in unreifen Astrozyten exprimiert (Bignami *et al.*, 1982) und findet sich im adulten Gehirn vermehrt bei reaktiver Astroglie (Norenberg, 1994; Schiffer *et al.*, 1986;

Stringer, 1996). Man nimmt an, dass während der Zellreifung Vimentin durch GFAP ersetzt wird und in einem gewissen Zeitraum während der Reifung beide Filamente koexprimiert werden (Galou *et al.*, 1996).

Hier wurde ein monoklonaler Ak verwendet, der an ein 57 kDa großes Filament bindet.

Durchführung der Immunhistochemie bei RT (soweit nicht anders angegeben):

1. Entparaffinieren
2. Zwischen dem Trocknen nach dem 100 %-igem und dem 96 %-igem Alkohol Blocken der endogenen Peroxidase in 1 %-igem  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Methanol 25 min
3. Vom Aqua dest. in Citratpuffer im vorgeheizten Dampfgerät (Braun Multi Gourmet) 20 min
4. Wässern in Leitungswasser ca. 5 min
5. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen
6. Mit ca. 300  $\mu\text{l}$  Pferde-Normalserum-Lösung (1:100 mit PBSA-Puffer verdünnt) pro OT beschichten und in eine feuchte Kammer verbringen 30 min
5. Serum abkippen, die OTs mit ca. 100  $\mu\text{l}$  Primär-Ak-Lösung (mouse-anti Vimentin, 1:100 mit PBSA verdünnt) pro OT beschichten, mit Parafilm bedecken und in eine feuchte Kammer verbringen über Nacht bei 4°C
6. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen
7. Mit ca. 100  $\mu\text{l}$  Sekundär-Ak-Lösung (horse-anti-mouse IgG) pro OT beschichten, mit Parafilm bedecken und in eine feuchte Kammer verbringen 30 min
8. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen

- 
- |     |  |                    |
|-----|--|--------------------|
| 9.  | Mit ca. 100µl frisch angesetzter ABC-Lösung pro OT beschichten,<br>mit Parafilm bedecken und in eine feuchte Kammer verbringen | 1 h                |
| 10. | Mehrmals mit Tween-Puffer spülen   |                    |
| 11. | Mit ca. 300 µl frisch angesetzter DAB-Lösung pro OT beschichten,<br>Dauer je nach Intensität der sichtbaren Braunfärbung       | 1-20 min           |
| 12. | Stoppen der Färbereaktion durch Spülen mit Aqua dest.  |                    |
| 13. | Gegenfärbung mit Hämalaun  | 4 min              |
| 14. | Bläuen in Leitungswasser   | 3-5 min            |
| 15. | Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe  | jeweils ca. 20 sec |
| 16. | Eindecken  |                    |

### 3.2.7.1.3 Neuronen

Neurofilament (NF) ist ein Intermediärfilament, das nahezu spezifisch für Neuronen ist.

Der monoklonale Ak markiert die 70 kDa und 200 kDa großen Polypeptide des Neurofilaments.

Durchführung der Immunhistochemie bei RT (soweit nicht anders angegeben):

- |    |  |        |
|----|--|--------|
| 1. | Entparaffinieren   |        |
| 2. | Zwischen dem Trocknen nach dem 100 %-igem und dem 96 %-igem Alkohol Blocken der endogenen Peroxidase in 1 %-igem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Methanol | 25 min |
| 3. | Vom Aqua dest. in Citratpuffer im vorgeheizten Dampfgarer (Braun Multi Gourmet)  | 20 min |

- 
- |     |  |                    |
|-----|--|--------------------|
| 4.  | Wässern in Leitungswasser  | ca. 5 min          |
| 5.  | Mehrmals mit Tween-Puffer spülen   |                    |
| 6.  | Mit ca. 300 µl Pferde-Normalserum-Lösung (1:100 mit PBSA-Puffer verdünnt) pro OT beschichten und in eine feuchte Kammer verbringen   | 30 min             |
| 5.  | Serum abkippen, die OTs mit ca. 100 µl Primär-Ak-Lösung (mouse-anti-Human Neurofilament, 1:50 mit PBSA verdünnt) pro OT beschichten, mit Parafilm bedecken und in eine feuchte Kammer verbringen | über Nacht bei 4°C |
| 6.  | Mehrmals mit Tween-Puffer spülen   |                    |
| 7.  | Mit ca. 100 µl Sekundär-Ak-Lösung (horse-anti-mouse IgG) pro OT beschichten, mit Parafilm bedecken und in eine feuchte Kammer verbringen   | 30 min             |
| 8.  | Mehrmals mit Tween-Puffer spülen   |                    |
| 9.  | Mit ca. 100µl frisch angesetzter ABC-Lösung pro OT beschichten, mit Parafilm bedecken und in eine feuchte Kammer verbringen  | 1 h                |
| 10. | Mehrmals mit Tween-Puffer spülen   |                    |
| 11. | Mit ca. 300 µl frisch angesetzter DAB-Lösung pro OT beschichten, Dauer je nach Intensität der sichtbaren Braunfärbung  | 1-20 min           |
| 12. | Stoppen der Färbereaktion durch Spülen mit Aqua dest.  |                    |
| 13. | Gegenfärbung mit Häkalaun  | 4 min              |
| 14. | Bläuen in Leitungswasser   | 3-5 min            |
| 15. | Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe  | jeweils ca. 20 sec |



## 16. Eindecken

### 3.2.7.2 Nachweis von *BDV*-Antigen

Der hier verwendete Primär-Ak richtet sich gegen das BDV-Nukleoprotein p38. Dieses wird vom BDV vom offenen Leserahmen ORF 1 codiert und kommt außer als p38 auch noch in der Isoform p40 vor.

Durchführung der Immunhistochemie bei RT (soweit nicht anders angegeben):

1. Entparaffinieren
2. Zwischen dem Trocknen nach dem 100 %-igem und dem 96 %-igem Alkohol Blocken der endogenen Peroxidase in 1 %-igem  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Methanol 25 min
3. Vom Aqua dest. in Tween-Puffer, mehrmals spülen
4. Mit ca. 300  $\mu\text{l}$  Pferde-Normalserum-Lösung (1:100 mit PBSA-Puffer verdünnt) pro OT beschichten und in eine feuchte Kammer verbringen 30 min
5. Serum abkippen, die OTs mit ca. 100  $\mu\text{l}$  Primär-Ak-Lösung pro OT beschichten, mit Parafilm bedecken und in eine feuchte Kammer verbringen über Nacht bei 4°C
6. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen
7. Mit ca. 100  $\mu\text{l}$  Sekundär-Ak-Lösung (horse-anti-mouse IgG) pro OT beschichten, mit Parafilm bedecken und in eine feuchte Kammer verbringen 30 min
8. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen
9. Mit ca. 100  $\mu\text{l}$  frisch angesetzter ABC-Lösung pro OT beschichten, mit Parafilm bedecken und in eine feuchte Kammer verbringen 1 h

- 
10. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen
  11. Mit ca. 300 µl frisch angesetzter DAB-Lösung pro OT beschichten, 1-20 min  
Dauer je nach Intensität der sichtbaren Braunfärbung
  12. Stoppen der Färbereaktion durch Spülen mit Aqua dest.
  13. Gegenfärbung mit Hämalaun 4 min
  14. Bläuen in Leitungswasser 3-5 min
  15. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe jeweils ca. 20 sec
  16. Eindecken

### 3.2.7.3 Entzündungszellen

Die immunhistochemischen Färbungen zur Darstellung von CD45<sup>+</sup>-Lymphozyten, CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten und Mikroglia/Makrophagen dienten zur Einschätzung der Immunreaktion des Gehirns und der Subtypisierung der vor allem in Infiltraten vorkommenden Lymphozyten. Der Nachweis von CD45<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten erfolgte durch den Einsatz CD-spezifischer Primärantikörper, für die Identifikation der Mikroglia/Makrophagen wurde der Ak-Klon ED1 verwendet, der als Homolog zum menschlichen CD68 gilt.

#### 3.2.7.3.1 CD45-positive Lymphozyten

Dieser Ak richtet sich gegen das Ratten CD45RC, die hochmolekulare Form des LCA (leucocyte common antigen). Dieses wird von B-Zellen exprimiert, von ca. 50 % der Knochenmarkszellen, von allen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und es spaltet CD4<sup>+</sup> Zellen in zwei Populationen, den CD4+CD45RC<sub>high</sub> (TH1-like) und den CD4+CD45RC<sub>low</sub> (TH2-like) (Angaben der Ak-herstellenden Firma).

Durchführung der Immunhistochemie bei RT (soweit nicht anders angegeben):

1. Entparaffinieren
2. Zwischen dem Trocknen nach dem 100 %-igem und dem 96 %-igem Alkohol Blocken der endogenen Peroxidase in 1 %-igem  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Methanol 25 min
3. Vom Aqua dest. in Citratpuffer im vorgeheizten Dampfgerät (Braun Multi Gourmet) 20 min
4. Wässern in Leitungswasser ca. 5 min
5. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen
6. Mit ca. 300  $\mu\text{l}$  Pferde-Normalserum-Lösung (1:100 mit PBSA-Puffer verdünnt) pro OT beschichten und in eine feuchte Kammer verbringen 30 min
5. Serum abkippen, die OTs mit ca. 100  $\mu\text{l}$  Primär-Ak-Lösung (mouse-anti-rat CD45, 1:200 mit PBSA verdünnt) pro OT beschichten, mit Parafilm bedecken und in eine feuchte Kammer verbringen über Nacht bei 4°C
6. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen
7. Mit ca. 100  $\mu\text{l}$  Sekundär-Ak-Lösung (horse-anti-mouse IgG) pro OT beschichten, mit Parafilm bedecken und in eine feuchte Kammer verbringen 30 min
8. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen
9. Mit ca. 100  $\mu\text{l}$  frisch angesetzter ABC-Lösung pro OT beschichten, mit Parafilm bedecken und in eine feuchte Kammer verbringen 1 h
10. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen
11. Mit ca. 300  $\mu\text{l}$  frisch angesetzter DAB-Lösung pro OT beschichten, Dauer je nach Intensität der sichtbaren Braunfärbung 1-20 min

- 
- |     |   |                    |
|-----|---|--------------------|
| 12. | Stoppen der Färbereaktion durch Spülen mit Aqua dest. |                    |
| 13. | Gegenfärbung mit Hämalan                              | 4 min              |
| 14. | Bläuen in Leitungswasser                              | 3-5 min            |
| 15. | Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe             | jeweils ca. 20 sec |
| 16. | Eindecken   |                    |

### 3.2.7.3.2 CD8-positive Lymphozyten

Dieser Ak erkennt das Ratten CD alpha Zelloberflächen-Antigen, das von einer Subpopulation der T-Lymphozyten, den meisten Thymozyten und der Mehrzahl der natürlichen Killerzellen exprimiert wird (Angaben der Ak-herstellenden Firma).

Durchführung der Immunhistochemie bei RT (soweit nicht anders angegeben):

- |    |   |                    |
|----|---|--------------------|
| 1. | Entparaffinieren  |                    |
| 2. | Zwischen dem Trocknen nach dem 100 %-igem und dem 96 %-igem Alkohol Blocken der endogenen Peroxidase in 1 %-igem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Methanol                                    | 25 min             |
| 3. | Vom Aqua dest. in Tween-Puffer, mehrmals spülen   |                    |
| 4. | Mit ca. 300 µl Pferde-Normalserum-Lösung (1:100 mit PBSA-Puffer verdünnt) pro OT beschichten und in eine feuchte Kammer verbringen  | 30 min             |
| 5. | Serum abkippen, die OTs mit ca. 100 µl Primär-Ak-Lösung (mouse-anti-rat CD8 Alpha, 1:100 mit PBSA verdünnt) pro OT beschichten, mit Parafilm bedecken und in eine feuchte Kammer verbringen | über Nacht bei 4°C |

6. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen
7. Mit ca. 100 µl Sekundär-Ak-Lösung (horse-anti-mouse IgG) pro OT beschichten, mit Parafilm bedecken und in eine feuchte Kammer verbringen 30 min
8. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen
9. Mit ca. 100µl frisch angesetzter ABC-Lösung pro OT beschichten, mit Parafilm bedecken und in eine feuchte Kammer verbringen 1 h
10. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen
11. Mit ca. 300 µl frisch angesetzter DAB-Lösung pro OT beschichten, Dauer je nach Intensität der sichtbaren Braunfärbung 1-20 min
12. Stoppen der Färbereaktion durch Spülen mit Aqua dest.
13. Gegenfärbung mit Hämalaun 4 min
14. Bläuen in Leitungswasser 3-5 min
15. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe jeweils ca. 20 sec
16. Eindecken

#### 3.2.7.3.3 *Mikroglia/Makrophagen*

Der Klon ED1 wird als Rattenhomolog für das menschliche CD68 betrachtet. Er bindet an das 110 kDa große Glykoprotein, das von Myeloidzellen auf der lysosomalen Membran exprimiert wird. Der Ak markiert die Mehrzahl der Gewebsmakrophagen und schwach periphere Blutgranulozyten (Angaben der Ak herstellenden Firma).

Durchführung der Immunhistochemie bei RT (soweit nicht anders angegeben):

1. Entparaffinieren
2. Zwischen dem Trocknen nach dem 100 %-igem und dem 96 %-igem Alkohol Blocken der endogenen Peroxidase in 1 %-igem  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Methanol 25 min
3. Vom Aqua dest. in 1 %iger Pronase-Lösung im Wärmeschrank ( $37^\circ\text{C}$ ) 10 min
4. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen
5. Mit ca. 300  $\mu\text{l}$  Pferde-Normalserum-Lösung (1:100 mit PBSA-Puffer verdünnt) pro OT beschichten und in eine feuchte Kammer verbringen 30 min
6. Serum abkippen, die OTs mit ca. 100  $\mu\text{l}$  Primär-Ak-Lösung (mouse-anti-rat CD68, 1:100 mit PBSA verdünnt) pro OT beschichten, mit Parafilm bedecken und in eine feuchte Kammer verbringen über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$
7. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen
8. Mit ca. 100  $\mu\text{l}$  Sekundär-Ak-Lösung (horse-anti-mouse IgG) pro OT beschichten, mit Parafilm bedecken und in eine feuchte Kammer verbringen 30 min
9. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen
10. Mit ca. 100  $\mu\text{l}$  frisch angesetzter ABC-Lösung pro OT beschichten, mit Parafilm bedecken und in eine feuchte Kammer verbringen 1 h
11. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen
12. Mit ca. 300  $\mu\text{l}$  frisch angesetzter DAB-Lösung pro OT beschichten, Dauer je nach Intensität der sichtbaren Braunfärbung 1-20 min
13. Stoppen der Färbereaktion durch Spülen mit Aqua dest.

- |   |                    |
|---|--------------------|
| 14. Gegenfärbung mit Hämalan                  | 4 min              |
| 15. Bläuen in Leitungswasser                  | 3-5 min            |
| 16. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe | jeweils ca. 20 sec |
| 17. Eindecken                                 |                    |

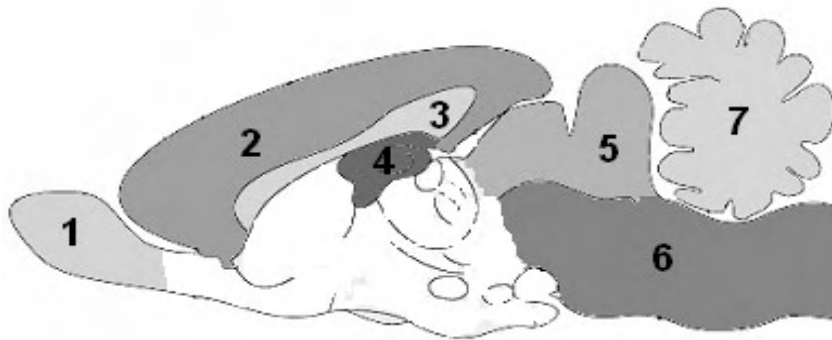
### **3.2.8 Eindecken**

Das Eindecken der OTs wurde nach allen Färbungen in gleicher Weise mit dem Eindeckautomat Leica CV 5030 mit Deckgläsern (ENGELBRECHT Medizin- und Labortechnik GmbH) durchgeführt.

### **3.2.9 Auswertung der Standard- und immunhistochemischen Färbungen**

Die Auswertung erfolgte anhand selbst erstellter Auswertungsbögen. Dazu wurde das Gehirn in sieben Areale eingeteilt (siehe *Abbildung 2*, Seite 54) und diese jeweils getrennt beurteilt. Bei einigen Färbungen wurden zusätzlich die Schichten des Bulbus olfactorius und/oder des Kleinhirns separat ausgewertet, da erhebliche Unterschiede innerhalb dieser Regionen festgestellt wurden.

Bei der Auswertung der ED1- und Glia-Marker wurden in jedem Areal jeweils in drei repräsentativen Gesichtsfeldern bei 400-facher Vergrößerung die angefärbten Zellen gezählt, der Mittelwert bestimmt und in Grade (+ bis +++) eingeteilt.



**Abbildung 2: Aufteilung des Rattengehirns in Regionen**

1: Bulbus olfactorius (Bo)

2: Cortex

3: Corpus callosum (Cc)

4: Hippocampus (HC)

5: Colliculi-Region/Mittelhirn  
(MH)

6: Stammhirn (SH)

7: Kleinhirn (KH)



## 4 Ergebnisse

Neben einer Beschreibung der Ergebnisse, wurden für die Färbungen zum besseren Vergleich der einzelnen Tiere Tabellen erstellt. Dabei wurden die in *Abbildung 2* dargestellten sieben Gehirnregionen einzeln bewertet und aufgeführt. Bei einigen Färbungen wurden zusätzlich die Schichten des Bulbus olfactorius und/oder des Kleinhirns separat ausgewertet, da erhebliche Unterschiede innerhalb dieser Regionen festgestellt wurden.

Bei einigen Gehirnen waren im Schnitt einzelne Areale nicht mehr vorhanden oder wurden bei der Einbettung so im Paraffin platziert, dass sie nicht immer mit angeschnitten wurden oder bei der Behandlung der Schnitte wiederholt von den Objektträgern abschwammen. In diesen Fällen wird bei dem betroffenen Areal in den Tabellen „n.v.“ (nicht vorhanden) angegeben.

Auch kam immer wieder vor, dass trotz mehrmaliger Wiederholung bestimmter Färbungen bei manchen Tieren einzelne Areale nicht bewertet werden konnten. Diese Bereiche sind in den Tabellen mit „n.a.“ (nicht auswertbar) bezeichnet.

Bei den Ergebnistabellen der HE/Nissl-, der BDV- und der CD45- sowie CD8-Färbungen wurden die Tiere in drei Gruppen eingeteilt, nämlich Kontrolltiere (Tiere, die nicht experimentell infiziert wurden und nicht in Kontakt mit infizierten Ratten kamen), neugeborenen aerosol (NBAE)-infizierte Tiere und Mütter sowie Sentinels, die zwar nicht infiziert wurden, aber in direktem Kontakt mit den NBAE-infizierten Ratten standen, sich also möglicherweise an diesen infiziert haben könnten.

Nach Auswertung dieser vier Färbungen wurde zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit der Ergebnisse in den danach aufgeführten Ergebnistabellen für ED1 und die drei Filamente GFAP, Vimentin und Neurofilament eine andere Gruppeneinteilung gewählt. Es sind jeweils vier Gruppen aufgeführt, nämlich Kontrolltiere, BDV-negative Tiere (damit sind Tiere gemeint, die zwar infiziert wurden, bzw. exponiert waren, aber in der BDV-Immunhistochemie keine angefärbten Zellen aufwiesen), BDV-positive NBAE-Tiere (Tiere, die in der BDV-Immunhistochemie angefärbte Zellen aufwiesen und bei denen keine CD45-positiven Infiltrate gefunden wurden) und Tiere mit Infiltraten (Tiere, die Infiltrate mit CD45-reaktiven Zellen zeigten).

#### 4.1 Krankheitsverlauf

Die Gehirne der Versuchstiere wurden von Prof. Dr. L. Stitz, Institut für Immunologie, Friedrich-Loeffler-Instituts des Bundesforschungsinstituts für Tiergesundheit in Tübingen zur Verfügung gestellt. Beobachtungen zum Verhalten und Allgemeinbefinden, RNA- und Antikörperbestimmung wurden dort ausgeführt. Die RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) zum Nachweis von BDV-RNA des p24-Proteins in peripheren mononukleären Blutzellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion durchgeführt. Zu gleichen Zeitpunkten erfolgte die Entnahme von Serum für die serologische Untersuchung auf BDV-spezifische Antikörper mittels ELISA. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in *Tabelle 1* aufgelistet.

Alle mit NBAE bezeichneten Tiere wurden innerhalb von maximal 18 Stunden nach der Geburt infiziert, in der Regel innerhalb von weniger als 12 Stunden.

Die erste Zahl des Tiernamens gibt den Wurf an, d.h. alle Tiere der gleichen Nummer gehören zu einem Wurf. Auch deren Mutter hat jeweils die gleiche Nummer im Namen.

Die laktierenden Muttertiere wurden nicht experimentell infiziert, erhielten aber ihre Jungen unmittelbar nach deren Virus aerosol-Exposition zurück, an denen sie sich gegebenenfalls anstecken konnten.

Teilweise blieben sogenannte Sentinels in der Gruppe. Das sind Wurfgeschwister, die nicht infiziert wurden. Diese und die Mütter tragen die Wurfnummer ohne „NBAE“ im Namen.

Alle nicht experimentell infizierten Tiere sind außerdem kursiv dargestellt.

Die Infektionsdosis ist angegeben in [ $\mu$ l], wobei eine 10%ige Gehirnsuspension infizierter und erkrankter Ratten auf ein Endvolumen von 1,5 – 2 ml aufgefüllt und verabreicht wurde.

**Tabelle 1: Allgemeine Informationen zu den Versuchstieren**

Angabe des Geschlechts, Alters, der Infektionsdosis, Auffälligkeiten vor der Tötung, Ergebnisse der PCR und Ak-Bestimmung (Titer)

Tier	Geschlecht	Alter bei Tötung [d]	Virusdosis	Symptome	PCR	Antikörper
<i>Neg Ko 4 Wo</i>	m	28	-	-	-	-
<i>Neg Ko 6 Wo</i>	w	42	-	-	-	-
<i>Neg Ko 8Wo</i>	m	56	-	-	-	-
<i>Lewis NL-1</i>	w	30	-	-	-	-
<i>Lewis NL-2</i>	w	30	-	-	-	-
<i>Lewis NL-3</i>	w	30	-	-	-	-
<i>Lewis NL-4</i>	m	30	-	-	-	-
0 NBAE.1	m	310	500	auff.	+	<40/80
0 NBAE.2	w	310	500	auff.	+	1280
0 NBAE.3	w	310	500	auff.	+	1280/2500
0 NBAE.4	m	690	500	unauff.	+	<40
0 NBAE.6	w	310	500	auff.	+	2500
VI NBAE.1	m	110	200	auff.	+	2500
VI NBAE.2	m	110	200	unauff.	+	1280/2500
VI NBAE.3	w	110	200	klein	n.t.	1280/2500
VI NBAE.4	w	110	200	n.t.	+	<40
VII NBAE.1	w	110	200	klein	+	<40
VII NBAE.2	w	110	200	groß	-	<40
VII NBAE.3	w	110	200	klein	+	1280
VII NBAE.4	w	110	200	auff.	-	160
VII NBAE.5	m	110	200	unauff.	+	<40
VII NBAE.6	m	110	200	g.A.	+	80/320
VII NBAE.7	m	110	200	g.A.	-	<40
<i>VII.8</i>	<i>m</i>	<i>110</i>	<i>n.i.</i>	<i>n.t.</i>	+	<40
<i>VII.9</i>	<i>m</i>	<i>110</i>	<i>n.i.</i>	<i>n.t.</i>	+	<40
VIII NBAE.3	m	450	400	unauff.	+	<40
VIII NBAE.7	w	90	400	auff.	+	160
IX NBAE.3	w	90	400	auff.	+	5000
IX NBAE.4	w	740	400	auff.	n.t.	<40/320
X NBAE.1	w	90	400	groß	+	<40
X NBAE.4	w	90	400	klein	+	1280/2500
<i>X.5</i>	<i>w</i>	<i>90</i>	<i>n.i.</i>	<i>n.t.</i>	+	<i>n.t.</i>
11 NBAE.1	w	11	500	n.t.	+	n.t.
11.NBAE.11	m	640	500	auff.	n.t.	<40
12 NBAE.1	m	7	500	n.t.	n.t.	n.t.
19 NBAE.1	m	28	1000	unauff.	n.t.	n.t.
19 NBAE.2	m	28	1000	unauff.	n.t.	n.t.
19 NBAE.3	w	28	1000	unauff.	n.t.	n.t.
19 NBAE.4	w	28	1000	unauff.	n.t.	n.t.
19 NBAE.5	w	28	1000	unauff.	n.t.	n.t.
<i>0.Mutter</i>	<i>w</i>	<i>105</i>	<i>n.i.</i>	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>	<i>160</i>
<i>11.Mutter</i>	<i>w</i>	<i>270</i>	<i>n.i.</i>	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>	<i>640</i>

Abkürzungen: m = männlich, w = weiblich, auff. = auffälliges Verhalten wie Ataxie, Schiefhaltung und ähnliches, unauff. = unauffällig, g.A. = gestörtes Allgemeinbefinden, n.t. = nicht getestet, n.i. = nicht infiziert (Sentinels)

#### **4.2 Neuropathologie**

Bei der HE- und KV (Nissl)-Färbung wurde jeweils der gesamte Schnitt untersucht und Auffälligkeiten festgehalten. Insbesondere wurde auf Gefäßveränderungen, Infiltrate, zellmorphologische Auffälligkeiten und Zelldichte (speziell die der Purkinje-Zellen im Kleinhirn verglichen mit den Kontrolltieren) geachtet.

Die Ergebnisse sind in *Tabelle 2* aufgeführt.

Veränderungen, die aufgrund der Aufbereitung des Gewebes entstanden sind oder tötungsbedingt (injizierte Gefäße, kleine Blutungen) auftreten, wurden vernachlässigt und in der Tabelle nicht aufgeführt.

**Tabelle 2: Befunde der HE- und KV-Färbung**

<b>Tier</b>	<b>Befunde, Auffälligkeiten, Vollständigkeit der Schnitte</b>
<b>Kontrolltiere</b>	
BDV neg Ko 4 Wo	o.b.B. - Bo fehlt
BDV neg Ko 6 Wo	o.b.B.
BDV neg Ko 8 Wo	o.b.B. - Bo fehlt
Lewis NL – 1	o.b.B.
Lewis NL – 2	o.b.B.
Lewis NL – 3	o.b.B.
Lewis NL – 4	o.b.B.
<b>NBAE-infizierte Tiere</b>	
0 NBAE.1	- Purkinje-Zelldichte vermindert - Bo fehlt
0 NBAE.2	- Purkinje-Zelldichte vermindert
0 NBAE.3	- Purkinje-Zelldichte vermindert
0 NBAE.4	- Purkinje-Zelldichte vermindert
0 NBAE.6	- Purkinje-Zelldichte vermindert - KH nicht ganz vollständig erhalten
VI NBAE.1	- etwas schräge Schnittebene, HC nicht angeschnitten - Purkinje-Zellschicht nicht beurteilbar
VI NBAE.2	- Purkinje-Zelldichte vermindert - 2 kleine rundkernige gefäßassoziierte Zellinfiltrate nasal des HC
VI NBAE.3	- Purkinje-Zelldichte vermindert
VI NBAE.4	o.b.B.
VII NBAE.1	- Purkinje-Zelldichte vermindert
VII NBAE.2	o.b.B.
VII NBAE.3	- Purkinje-Zelldichte vermindert
VII NBAE.4	- Purkinje-Zelldichte vermindert - Mehrere rundkernige gefäßassoziierte Zellinfiltrate in allen Regionen außer SH und KH
VII NBAE.5	- Purkinje-Zelldichte vermindert - Bo fehlt
VII NBAE.6	- Purkinje-Zelldichte vermindert - HC nicht beurteilbar
VII NBAE.7	- Purkinje-Zellschicht nicht beurteilbar - kleine rundkernige gefäßassoziierte Zellinfiltrate im gesamten Gehirn außer KH - HC nicht vorhanden
VIII NBAE.3	- Purkinje-Zelldichte vermindert
VIII NBAE.7	- Purkinje-Zelldichte vermindert
IX NBAE.3	- Purkinje-Zelldichte vermindert - kleine Zellansammlung nasal des HC im Randbereich
IX NBAE.4	- Purkinje-Zelldichte vermindert - zwischen Molekular- und Körnerschicht des KH vermehrt kleine chromatinarme Zellen
X NBAE.1	o.b.B.
X NBAE.4	- Purkinje-Zelldichte vermindert - kleine rundkernige gefäßassoziierte Zellinfiltrate in Bo, Cortex und MH
11 NBAE.1	- vom Bo ist nur das Stratum fibrosum vorhanden - dem Alter entsprechend sind im KH die Schichten noch nicht vollständig ausgebildet - HC nicht vorhanden

**Tabelle 2 (Fortsetzung)**

<b>Tier</b>	<b>Befunde, Auffälligkeiten, Vollständigkeit der Schnitte</b>
11 NBAE.11	- Purkinje-Zelldichte vermindert
12 NBAE.1	- dem Alter des Tieres entsprechend sind die Schichten des KH noch nicht vollständig ausgebildet
19 NBAE.1	- kleine rundkernige gefäßassoziierte Zellinfiltrate im gesamten Gehirn außer KH
19 NBAE.2	- vereinzelt kleine gefäßassoziierte Zellinfiltrate in Cortex und SH
19 NBAE.3	- kleine rundkernige gefäßassoziierte Zellinfiltrate im gesamten Gehirn
19 NBAE.4	- kleine rundkernige gefäßassoziierte Zellinfiltrate im gesamten Gehirn - schräge Schnittebene: Bo fehlt; MH und SH nur teilweise vorhanden; Cortex, HC, Cc beider Gehirnhälften angeschnitten
19 NBAE.5	- kleine rundkernige gefäßassoziierte Zellinfiltrate im gesamten Gehirn außer KH
<b>Mütter und Sentinels</b>	
0.Mu	- mehrere kleine rundkernige gefäßassoziierte Zellinfiltrate im Cortex
11.Mu	- kleine rundkernige gefäßassoziierte Zellinfiltrate im gesamten Gehirn außer KH
VII.8	o.b.B.
VII.9	o.b.B.
X.5	o.b.B.

Abkürzungen: o.b.B. = ohne besonderen Befund, Bo = Bulbus olfactorius, HC = Hippocampus, SH = Stammhirn, KH = Kleinhirn, MH = Mittelhirn, Cc = Corpus callosum

Alle Kontrolltiere waren frei von Auffälligkeiten.

In der Gruppe der NBAE-infizierten Ratten wiesen neun der 30 Tiere rundkernige Zellinfiltrate auf (*Abb. 3A*, Seite 61). Davon hatten zwei Ratten (Tiere aus der Gruppe 19) Infiltrate in allen Arealen, drei (zwei Tiere aus der Gruppe 19 und VII NBAE.7) in allen Arealen außer im Kleinhirn, Tier VII NBAE.4 überall außer in Stammhirn und Kleinhirn, Tier X NBAE.4 im Bulbus olfactorius, Cortex und Mittelhirn und Tier VI NBAE.2 im Hippocampus. Bei dem Tier IX NBAE.3 wurde nasal des Hippocampus eine Zellansammlung beobachtet, die sich allerdings im Randbereich befand und nicht klar als im Gewebe befindliches Infiltrat angesprochen werden konnte.

Bei 18 der 30 Tiere war die Purkinje-Zellzahl im Kleinhirn vermindert (*Abb. 3D*).

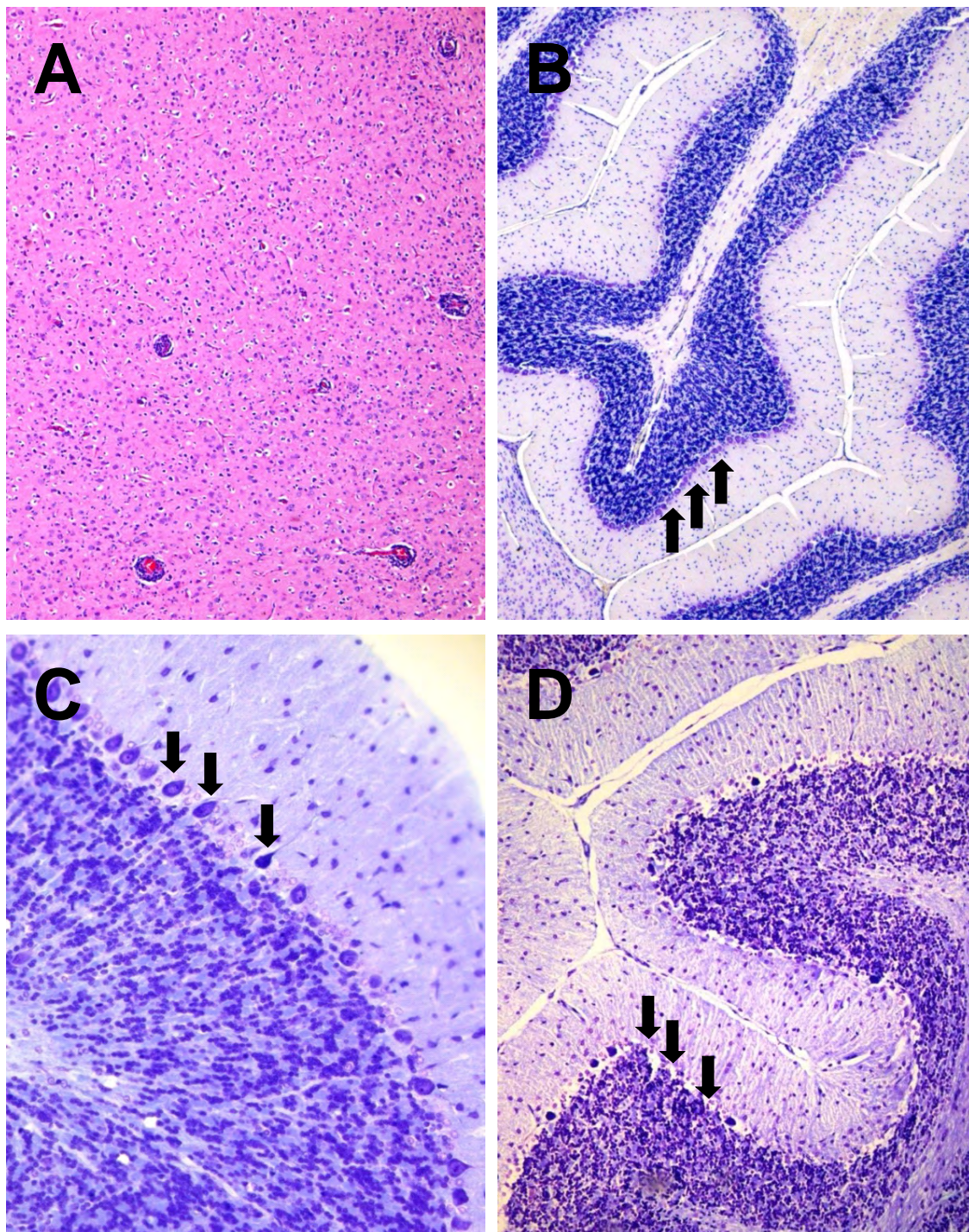
Bei der Ratte mit der Nummer IX NBAE.4 fielen kleine Zellen mit runden chromatinarmen Kernen auf, die sich im Kleinhirn im Bereich der Purkinje-Zellschicht befanden.

Alle drei Sentinels blieben ohne besonderen Befund.

Beide Muttertiere hatten eine unveränderte Purkinje-Zellzahl (*Abb. 3C*), aber Infiltrate im Cortex, bzw. im gesamten Gehirn außer im Kleinhirn.

Zusätzlich ist in *Abbildung 3B* das Kleinhirn eines Kontrolltieres mit unveränderter Purkinje-Zellzahl dargestellt.





**Abbildung 3: Infiltrate im Cortex und Purkinje-Zelldichte im Kleinhirn**

- A:** mononukleäre gefäßassoziierte Infiltrate im Cortex der 110 Tage alten NBAE-infizierten Ratte VII NBAE.7 mit Entzündung (HE, Vergrößerung x75)
- B:** unveränderte Purkinje-Zelldichte (Pfeile) bei einem Kontrolltier (Lewis NL-1; KV, Vergrößerung x75)
- C:** unveränderte Purkinje-Zelldichte (Pfeile) bei dem BDV-positiven Muttertier 0.Mu (KV, Vergrößerung x160)
- D:** deutlich verminderte Purkinje-Zelldichte (Pfeile) bei dem NBAE-infizierten 110 Tage alten Tier VI NBAE.2 ohne Infiltrate (KV, Vergrößerung x100)

### 4.3 Infektionsausbreitung

Bei dieser immunhistochemischen Färbung wurde das p38-Protein des BD-Virus nachgewiesen.

Zur Auswertung wurden je genannter Region bei 400-facher Vergrößerung in zwei bis drei repräsentativen Gesichtsfeldern die gesamten und die p38-positiven Zellen (Zytoplasma und/oder Nukleus) ausgezählt und aus dem Mittelwert der prozentuale Anteil infizierter Zellen an der Gesamtzellzahl ermittelt. Da teilweise große Unterschiede zwischen den Ergebnissen für die einzelnen Schichten des Bulbus olfactorius und des Kleinhirns sowie der Neuronenschicht und den sonstigen Zellen des Hippocampus bestanden, wurden diese getrennt beurteilt. Die Ergebnisse in [%] sind in *Tabelle 3* aufgeführt.

Bei den Kontrollratten wurde die Immunhistochemie mit dem Anti-p38-Antikörper ebenfalls durchgeführt und war bei allen Tieren negativ. Diese Tiere sind daher in *Tabelle 3* nicht mitaufgeführt.



**Tabelle 3: BDV-p38**

Anteil der infizierten Zellen an der Gesamtzellzahl der entsprechenden Hirnregion [%]

Tier	Bulbus olfactorius					Cortex	Corpus cal.	Hippoc.		Mittelhirn	Stammhirn	Kleinhirn			
	Str. fibrosum ext.	Str. glomerulosum	Str. plexiforme ext.	Str. mitrale	Str. granulosum ext.			Pyramidenzellschicht	Exkl. Pyramid.			Mark	Körnerschicht	PC-Schicht	Molekularschicht
NBAE-infizierte Tiere															
0 NBAE.1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	25	10	45	20	30	10	10	27	17	12
0 NBAE.2	<1	1	2	<1	<1	25	13	27	15	8	5	18	45	10	7
0 NBAE.3	3	7	8	7	1	28	5	50	5	17	18	8	40	8	10
0 NBAE.4	3	5	3	5	12	40	3	50	15	25	4	25	35	35	35
0 NBAE.6	10	13	5	3	15	55	48	70	25	45	40	20	16	15	25
VI NBAE.1	0	0	0	1	1	22	15	60	10	12	8	8	5	10	3
VI NBAE.2	0	2	3	5	3	23	2	80	10	4	2	1	3	20	5
VI NBAE.3	0	<1	<1	0	1	15	<1	45	5	30	10	2	3	10	2
VI NBAE.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VII NBAE.1	5	6	5	5	7	20	7	n.v.	n.v.	30	20	15	15	60	5
VII NBAE.2	0	<1	<1	1	<1	<1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VII NBAE.3	5	10	7	12	15	25	20	65	10	35	40	50	40	20	20
VII NBAE.4	5	20	20	30	25	30	10	50	5	10	30	5	3	25	5
VII NBAE.5	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	40	30	70	30	15	20	35	15	50	10
VII NBAE.6	10	15	5	20	25	30	10	65	15	10	15	25	5	10	5
VII NBAE.7	<1	7	3	30	30	25	1	80	40	3	10	5	1	4	1
VIII NBAE.3	2	4	5	2	10	65	30	60	25	25	15	5	10	15	30
VIII NBAE.7	1	5	3	2	5	25	15	85	50	30	30	10	4	10	5
IX NBAE.3	1	6	5	8	10	50	35	60	40	25	5	6	15	5	5
IX NBAE.4	1	5	3	n.a.	12	35	35	78	30	33	25	20	7	50	40
X NBAE.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X NBAE.4	20	8	4	5	12	38	20	43	10	20	15	32	10	20	4
11 NBAE.1	0	0	0	0	0	0	0	n.v.	n.v.	1	<1	0	0	0	0
11 NBAE.11	n.a.	2	n.a.	n.a.	n.a.	35	10	75	37	20	5	4	2	35	6
12 NBAE.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19 NBAE.1	3	5	5	n.v.	n.v.	60	35	n.v.	n.v.	40	45	48	9	35	20
19 NBAE.2	1	12	8	n.v.	n.v.	27	55	65	15	38	20	25	4	25	3
19 NBAE.3	n.v.	12	12	5	25	42	33	75	25	23	26	30	4	33	20
19 NBAE.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19 NBAE.5	n.v.	8	6	12	25	20	35	52	10	37	18	30	4	7	2
Mütter und Sentinels															
0.Mu	<1	1	4	10	5	35	30	10	10	6	23	3	0	3	1
11.Mu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VII.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VII.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Abkürzungen: Str. = Stratum, ext. = externum, cal. = callosum, Hippoc. = Hippocampus, exkl. Pyramid. = Zellen des HC ohne die Pyramidenzellen, n.v. = nicht vorhanden, n.a. = nicht auswertbar

In fast allen Regionen, in denen eine Anfärbung festzustellen war, gab es sowohl Zellen, bei denen entweder nur der Zellkern oder das Zytoplasma, als auch Zellen, bei denen beide Zellkompartimente angefärbt waren (*Abb. 4A,C*, Seite 66).

Rundkernige Zellen um Infiltrate waren nicht anfärbbar (*Abb. 4C*).

Insgesamt lässt sich sagen, dass das BDV p38-Protein in den Gehirnen infizierter Tiere weit verbreitet ist (*Abb. 4A-D*). Nahezu alle BDV-positiven Tiere wiesen angefärbte Zellen in allen Regionen auf. Bei zwei Tieren (VII NBAE.2 und 11 NBAE.1) zeigten sich nur vereinzelte angefärbte Zellen in Bulbus olfactorius und nasalem Cortex, bzw. Mittelhirn (insgesamt circa 35 angefärbte Zellen) und Stammhirn (insgesamt circa 4 angefärbte Zellen) (*Abb. 4E, F*) und vier Tiere hatten BDV p38-negative Schichten im Bulbus olfactorius. Nur eines der nicht experimentell infizierten Tiere war in der Immunhistochemie positiv, nämlich das Muttertier 0.Mu, wenn auch mit vergleichsweise niedrigem Anteil infizierter Zellen und ungleichmäßiger Verteilung dieser (*Abb. 4D*). Das zweite Muttertier 11.Mu und die vier Sentinels wiesen keine angefärbten Zellen auf. Außerdem zeigten vier der 30 NBAE-infizierten Ratten trotz experimenteller NBAE-Infektion (je ein Tier das mit Dosis 200, 400, 500 und 1000 infiziert wurde) keine angefärbten Zellen in der p38-Immunhistochemie.

Eine besonders hohe Prozentzahl angefärbter Zellen fand sich in der Purkinje-Zellschicht des Kleinhirns (bis 60%) und in der Pyramidenzellschicht des Hippocampus (bis 85%), aber auch im Cortex kamen teilweise Werte bis 65% vor.

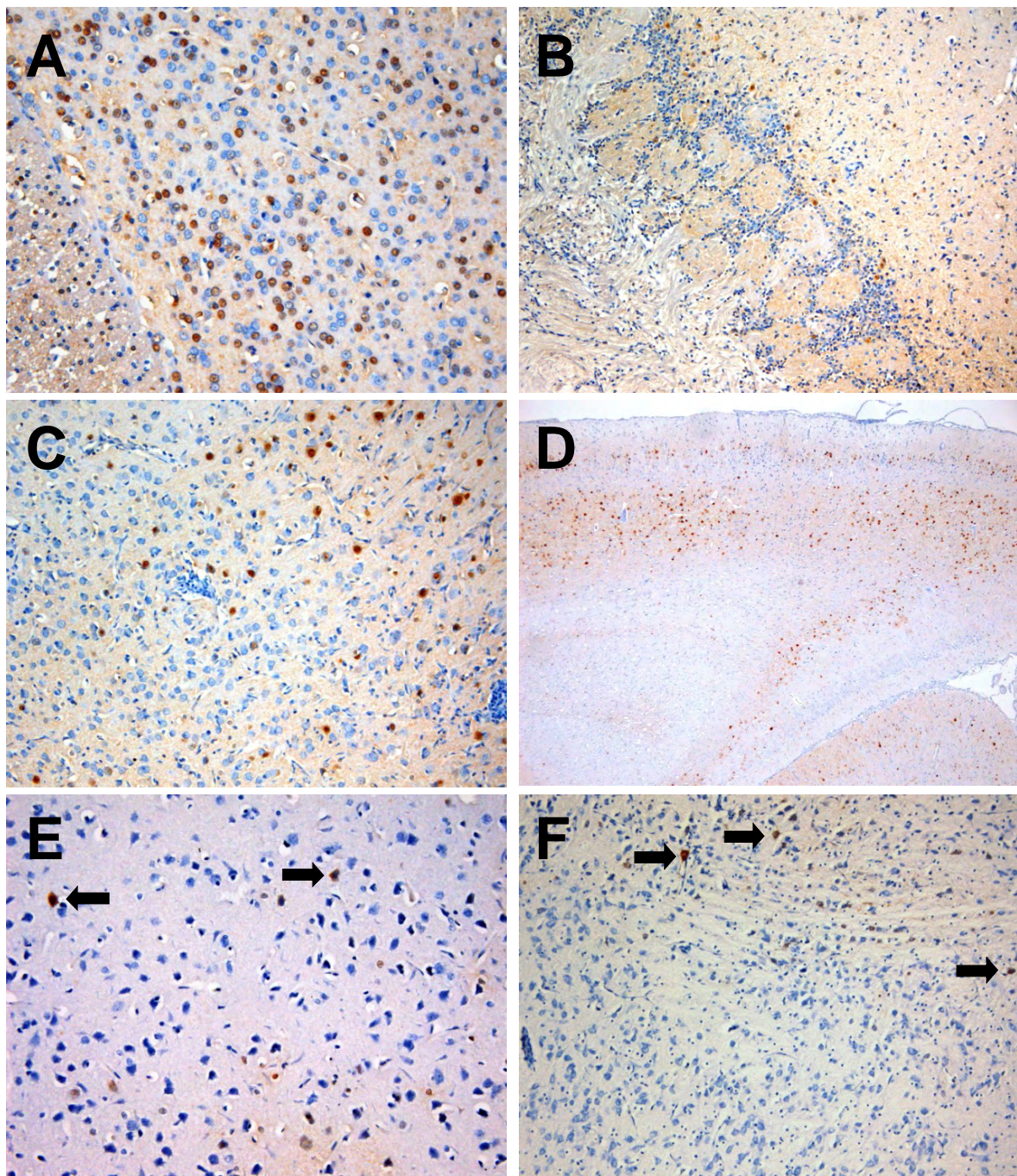
In den Schichten des Kleinhirns gab es große Schwankungen zwischen den Tieren. So wurde bei einigen Tieren in der Purkinje-Zellschicht der höchste Anteil innerhalb des Kleinhirns erreicht, bei anderen waren dort aber auch weniger Zellen betroffen als in den anderen Schichten. In der Molekularschicht waren in vielen Fällen nur 1-10 % betroffen, teilweise aber auch bis zu 40% und mehr als in den anderen Schichten bei diesen Tieren. Ähnliche Verteilungsmuster ergaben sich bei der Beurteilung des Kleinhirnmarks und der Körnerzellschicht.

Im Bulbus olfactorius war der Anteil an positiven Zellen in allen Schichten eher gering (*Abb. 4B*), nur bei zwei Tieren (VII NBAE.4 und VII NBAE.7), die im Bulbus olfactorius auch rundkernige Infiltrate aufwiesen, wurden Anteile von über 25% erreicht.

Bei sieben Tieren (0 NBAE.1, 0 NBAE.2, VII NBAE.5, IX NBAE.4, 11 NBAE.11, 0.Mu, 19 NBAE.1) war die Verteilung angefärbter Zellen in Cortex, Stammhirn und/oder Kleinhirnmarmark nicht fokal, aber nasodorsal, peripher, dorsal, ventral oder zentral fand sich ein größerer oder geringerer Anteil angefärbter Zellen.

Tier X NBAE.4 zeigte im Stammhirn, Tier 19 NBAE.3 in der Molekularschicht des Kleinhirns und Tier 0.Mu im Cortex eine auffallend ungleichmäßige Verteilung angefärbter Zellen (*Abb. 4D*).

Bei vier Tieren (VI NBAE.3, VII NBAE.5, VII NBAE.6, 0.Mu) waren einige positive Zellen in der Körnerschicht des Kleinhirns auffällig, die morphologisch den Purkinjezellen ähnelten und bei den übrigen Tieren nicht zu finden waren.



**Abbildung 4: Infektionsausbreitung**

- A: zahlreiche p38-positive Zellen (braun) im Cortex von Tier 0 NBAE.1 (Vergrößerung x125)  
 B: infizierte Zellen (braun) im Bulbus olfactorius von Tier VI NBAE.2 (Vergrößerung x75)  
 C: p38-positive Zellen (braun) im Cortex von Tier VII NBAE.7 (Vergrößerung x125)  
 D: typisch ungleichmäßige Verteilung infizierter Zellen bei einem adult infizierten Tier (0.Mu; Vergrößerung x16)  
 E: einzelne p38-positive Zellen (Pfeile) im Cortex des neugeborenen infizierten Tieres VII NBAE.2 (Vergrößerung x125)  
 F: einzelne p38-positive Zellen (Pfeile) im Stammhirn des neugeborenen infizierten Tieres 11 NBAE.1 (Vergrößerung x100)

## 4.4 Nachweis von Immunzellen

### 4.4.1 Lymphozyten (CD45-positiv)

Dieser Antikörper erkennt das Ratten CD45RC, die hochmolekulare Form des leucocyte common antigen (LCA). Dieses Antigen befindet sich auf B-Zellen, circa 50% der Knochenmarkszellen, allen CD8-positiven T-Zellen und teilt die CD4-positiven T-Zellen in zwei Populationen, CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>high</sup> (Th1-like) und CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>low</sup> (Th2-like).

Die immunhistochemische Färbung mit dem Anti-CD45-Antikörper wurde bei allen Tieren durchgeführt.

Bei sämtlichen Schnitten fanden sich vereinzelt positive Zellen mit typischer Lymphozytenmorphologie außerhalb des Gehirngewebes im Bereich der Meningen.

Da dies auch bei gesunden Ratten normal ist und bei allen Tieren inklusive der Kontrolltiere der Fall war, wird das Vorhandensein solcher Zellen bei der Beschreibung der Ergebnisse nicht erwähnt, diente aber bei jedem einzelnen Schnitt als Bestätigung für das Gelingen der Färbung.

Bei einigen Gehirnen, auch bei den Kontrolltieren, waren ganz vereinzelt positive Zellen in den Außenbereichen des Gehirnparenchyms zu sehen. Möglicherweise stellt dies lediglich eine Folge der Bearbeitung der Schnitte dar, bei dem sich kleine Gewebeteile oder einzelne Zellen, die sich außerhalb des Parenchyms befanden, bei bestimmten Arbeitsschritten über das eigentliche Gehirngewebe legen oder es handelt sich dabei um patrouillierende Lymphozyten. Diese wurden nicht als Befund gewertet, wenn insgesamt weniger als fünf angefärbte Zellen im Gewebe detektiert wurden.

Bei der Auswertung der Färbung wurde insbesondere auf folgende Punkte geachtet:

- deutliche Erhöhung der positiven Zellen in den Meningen (*Abb. 5A*, Seite 71)
- positive Zellen im Hirngewebe, nicht gefäßassoziiert (*Abb. 5A, C*)
- positive Zellen gefäßassoziiert (Infiltrate) (*Abb. 5C, D*)
- prozentualer Anteil positiver Zellen an der Gesamtzellzahl gefäßassoziierter Infiltrate (durch Auszählen der Zellkerne)

Die Ergebnisse sind in *Tabelle 4* aufgeführt.

**Tabelle 4: Befunde der CD45-Immunhistochemie (Lymphozyten)**

<b>Tier</b>	<b>Ergebnisse der CD45-Färbung</b>
<b>Kontrolltiere</b>	
BDV neg Ko 4 Wo	- o.b.B.
BDV neg Ko 6 Wo	- o.b.B.
BDV neg Ko 8 Wo	- o.b.B.
Lewis NL – 1	- o.b.B.
Lewis NL – 2	- o.b.B.
Lewis NL – 3	- o.b.B.
Lewis NL – 4	- o.b.B.
<b>NBAE-infizierte Tiere</b>	
0 NBAE.1	- o.b.B.
0 NBAE.2	- stark erhöhte Anzahl positiver Zellen in den Meningen
0 NBAE.3	- ganz vereinzelt positive, nicht erkennbar gefäßassoziierte Zellen diffus im Hirnparenchym
0 NBAE.4	- o.b.B.
0 NBAE.6	- o.b.B.
VI NBAE.1	- o.b.B.
VI NBAE.2	- in HC und Cc ganz vereinzelt positive, nicht erkennbar gefäßassoziierte Zellen im Hirnparenchym
VI NBAE.3	- o.b.B.
VI NBAE.4	- o.b.B.
VII NBAE.1	- o.b.B.
VII NBAE.2	- o.b.B.
VII NBAE.3	- o.b.B.
VII NBAE.4	- einzelne positive, nicht erkennbar gefäßassoziierte positive Zellen (10) diffus im Parenchym des HC - positive Zellen in gefäßassoziierten Infiltraten; dabei waren je ausgezähltem Infiltrat (insgesamt 10, davon 6 im Cortex, 1 im Cc, 1 im HC, 2 im MH) 2,5-40 % der Zellen CD45-positiv, Gesamtanteil aller ausgezählten Infiltrate: 18,7 % (301/1610)
VII NBAE.5	- o.b.B.
VII NBAE.6	- o.b.B.
VII NBAE.7	- zahlreiche positive, nicht erkennbar gefäßassoziierte Zellen diffus im Gewebe, besonders im HC - positive Zellen in gefäßassoziierten Infiltraten, dabei waren in 19 ausgezählten Infiltraten (davon 2 im Bo, 5 im Cortex, 7 ventral des HC und Cc, 2 im MH, 3 im SH) 16,7-81,8 % der Zellen CD45-positiv, Gesamtanteil aller ausgezählten Infiltrate: 59,5 % (843/1417)
VIII NBAE.3	- o.b.B.
VIII NBAE.7	- leicht erhöhte Anzahl positiver Zellen in den Meningen
IX NBAE.3	- stark erhöhte Anzahl positiver Zellen in den Meningen - nasal des HC im Randbereich fokal einige positive Zellen
IX NBAE.4	- o.b.B.
X NBAE.1	- o.b.B.
X NBAE.4	- wenige positive Zellen (5) im Bo
11 NBAE.1	- o.b.B.
11 NBAE.11	- o.b.B.
12 NBAE.1	- o.b.B.



Tabelle 4 (Fortsetzung)

Tier	Ergebnisse der CD45-Färbung
19 NBAE.1	- stark erhöhte Anzahl positiver Zellen in den Meningen - positive Zellen in gefäßassoziierten Infiltraten, dabei waren in 10 ausgezählten Infiltraten (davon 7 im Cortex, 1 im Cc, 2 im MH) 0-75 % der Zellen CD45-positiv, Gesamtanteil aller ausgezählten Infiltrate: 46,9 % (61/130)
19 NBAE.2	- leicht erhöhte Anzahl positiver Zellen in den Meningen - ein Infiltrat im Cortex mit 21,54 % (14/65) positiven Zellen - Teile des Cortex, Cc und HC nicht auswertbar
19 NBAE.3	- leicht erhöhte Anzahl positiver Zellen in den Meningen - im gesamten Hirnparenchym diffus einige positive Zellen im Gewebe - positive Zellen in gefäßassoziierten Infiltraten, dabei waren in 12 ausgezählten Infiltraten (davon 8 im Cortex, 2 im MH, 2 im SH) 23,1-50 % der Zellen CD45-positiv, Gesamtanteil aller ausgezählten Infiltrate: 33,14 % (56/169)
19 NBAE.4	- o.b.B.
19 NBAE.5	- stark erhöhte Anzahl positiver Zellen in den Meningen - im gesamten Hirnparenchym außer im KH diffus einige positive Zellen im Gewebe - positive Zellen in gefäßassoziierten Infiltraten, dabei waren in 14 ausgezählten Infiltraten (davon 2 im Bo, 7 im Cortex, 1 im HC, 1 ventral des HC, 1 im MH, 2 im SH) 16,41-68,42 % der Zellen CD45-positiv, Gesamtanteil aller ausgezählten Infiltrate: 28,7 % (262/913)
Mütter und Sentinels	
0.Mu	- stark erhöhte Anzahl positiver Zellen in den Meningen - positive Zellen in gefäßassoziierten Infiltraten, dabei waren in 9 ausgezählten Infiltraten (davon 1 im Bo, 1 im Cortex, 3 im MH, 1 nasal des HC, 3 im SH) 11-39 % der Zellen CD45- positiv, Gesamtanteil aller ausgezählten Infiltrate: 23,86 % (126/528)
11.Mu	- im gesamten Hirnparenchym diffus einige positive Zellen im Gewebe - positive Zellen in gefäßassoziierten Infiltraten, dabei waren je ausgezähltem Infiltrat (insgesamt 7, davon 4 im Bo, 2 im Cc im Cortex, 1 im MH) 10-45 % der Zellen CD45-positiv, Gesamtanteil aller ausgezählten Infiltrate: 37,9 % (163/430)
VII.8	- o.b.B.
VII.9	- o.b.B.
X.5	- o.b.B.

Abkürzungen: o.b.B. = ohne besonderen Befund, HC = Hippocampus, Cc = Corpus callosum, MH = Mittelhirn, Bo = Bulbus olfactorius, SH = Stammhirn, KH = Kleinhirn

Morphologisch stellen sich positive Zellen als rund bis oval mit großem rundem Kern und wenig Zytoplasma dar, das sich durch die immunhistochemische Färbung braun färbte (Abb. 5, Seite 71).

Alle Kontrolltiere waren frei von angefärbten Zellen im Gewebe.

Sieben der 30 NBAE-infizierten Tieren wiesen vermehrt angefärbte Zellen in den Meningen auf (Abb. 5A), vier Ratten zeigten mit dem CD45-Antikörper reagierende Zellen diffus im Gewebe verteilt, fünf Tiere einzelne angefärbte Zellen in einem oder mehreren Arealen und sieben Tiere wiesen CD45-positive gefäßassoziierte Zellinfiltrate (Abb. 5C, D) auf. Dabei waren bei fünf Tieren entweder nur vermehrt in den Meningen oder vereinzelt im Gewebe

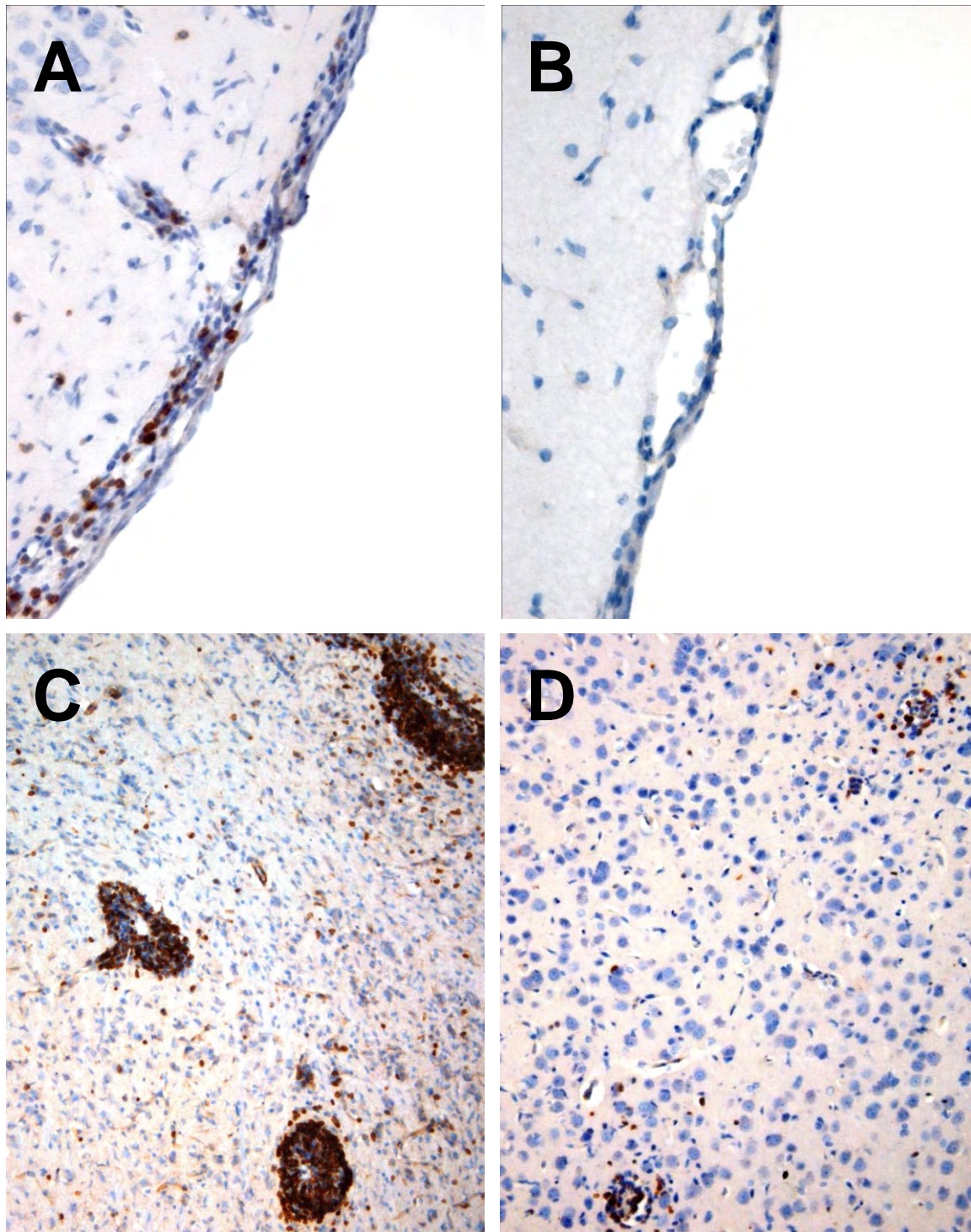
positive Zellen, bei einem in den Meningen vermehrt und im Gewebe vereinzelte Zellen in einzelnen Arealen. Bei einem Tier waren in den Meningen vermehrt positive Zellen und Infiltrate im Parenchym. Bei fünf Ratten waren sowohl in gefäßassoziierten Infiltraten als auch diffus im Gewebe angefärbte Zellen zu finden.

Der Anteil von CD45-reaktiven Zellen an der Gesamtzahl der Zellen der Infiltrate schwankte relativ stark von Infiltraten ohne CD45-reaktive Zellen bis 88,9 % und lag bei den einzelnen Tieren im Schnitt zwischen 18,7-67,6 %. Nur in einem kleinen Infiltrat wurden keinerlei CD45-positive Zellen detektiert, ansonsten waren in allen gefäßassoziierten Zellansammlungen positive Zellen zu finden.

Beide Muttertiere wiesen zahlreiche Infiltrate mit einem mäßigem Anteil an CD45-positiven Zellen auf. Die 0.Mu hatte außerdem eine erhöhte Zahl positiver Zellen in den Meningen, 11.Mu positive Zellen diffus im gesamten Gehirnparenchym.

Alle drei Sentinels zeigten in dieser Immunhistochemie keine Anfärbung.





**Abbildung 5: Immunreaktion (Lymphozyten, CD45-Immunhistochemie)**

**A:** vermehrt angefärbte Zellen in den Meningen des NBAE-infizierten Tieres 19 NBAE.5 (Vergrößerung x150)

**B:** Keine Erhöhung der angefärbten Zellen in den Meningen von Tier VII NBAE.1; Areal ohne CD45<sup>+</sup> Zellen dargestellt (Vergrößerung x160)

**C:** angefärbte Zellen diffus im Gewebe und in Infiltraten im Mittelhirn von Tier VII NBAE.7 (Vergrößerung x85)

**D:** kleine Infiltrate mit angefärbten Zellen und einzelne angefärbte Zellen im Gewebe im Cortex von Tier 19 NBAE.1 (Vergrößerung x135)

#### **4.4.2 Lymphozyten (CD8-positiv)**

Der hier verwendete Antikörper MCA48R erkennt das Ratten CD8 alpha Zelloberflächenantigen, das von einer Subpopulation von T-Lymphozyten, den meisten Thymozyten und der Mehrzahl der NK Zellen exprimiert wird.

Da alle Zellen, die mit diesem Antikörper reagieren auch in der Immunhistochemie mit dem Anti-CD45-Antikörper angefärbt werden, sind bei Tieren, bei denen keine erhöhte Anzahl von CD45-reaktiven Zellen gefunden wurde, keine vermehrt CD8-reaktiven Zellen zu erwarten. Daher wurde die CD8-Immunhistochemie nur in den Fällen durchgeführt, bei denen bei der CD45-Färbung vermehrt Entzündungszellen gefunden wurden.

Die Bewertung erfolgte anhand derselben Gesichtspunkte wie bei der CD45-Immunhistochemie.

Auch bei dieser Immunhistochemie waren bei allen Tieren sehr vereinzelt positive Zellen in den Meningen zu finden. Dies wurde in *Tabelle 5* nicht als besonderer Befund aufgeführt.

**Tabelle 5: Befunde der CD8-Immunhistochemie**

Tier	Ergebnisse der CD8-Färbung
<b>NBAE-infizierte Tiere</b>	
0 NBAE.2	- o.b.B.
0 NBAE.3	- o.b.B.
VI NBAE.2	- o.b.B.
VII NBAE.4	- in 7 ausgezählten Infiltraten waren 0,4-11,54 % der Zellen positiv, Gesamtanteil aller ausgezählten Infiltrate: 3,25% (40/1230)
VII NBAE.7	- einzelne positive, nicht erkennbar gefäßassoziierte positive Zellen im HC - in einem ausgezählten Infiltrat im SH waren 16,7 % (20/120) der Zellen positiv
VIII NBAE.7	- geringgradig erhöhte Anzahl positiver Zellen in den Meningen
IX NBAE.3	- geringgradig erhöhte Anzahl positiver Zellen in den Meningen
X NBAE.4	- o.b.B.
19 NBAE.1	- geringgradig erhöhte Anzahl positiver Zellen in den Meningen - Zellen in gefäßassoziierten Zellinfiltraten CD8-negativ
19 NBAE.2	- o.b.B.
19 NBAE.3	- o.b.B.
19 NBAE.5	- leicht erhöhte Anzahl positiver Zellen in den Meningen - Zellen in gefäßassoziierten Zellinfiltraten CD8-negativ
<b>Mütter und Sentinels</b>	
0.Mu	- Erhöhte Anzahl positiver Zellen in den Meningen - einzelne positive Zellen im Parenchym, besonders im HC und Bo - in 7 ausgezählten Infiltraten waren 0-33,3 % der Zellen positiv, Gesamtanteil aller ausgezählten Infiltrate: 9,93 % (15/151)
11.Mu	- einzelne positive, nicht erkennbar gefäßassoziierte positive Zellen, vor allem im Bo und nasoventral im Cortex - in 3 ausgezählten Infiltraten waren 4,5-30 % der Zellen positiv, Gesamtanteil aller ausgezählten Infiltrate: 10,7 % (33/310)

Abkürzungen: o.b.B. = ohne besonderen Befund, HC = Hippocampus, SH = Stammhirn, Bo = Bulbus olfactorius, MH = Mittelhirn

Die Morphologie der positiven Zellen entsprach der der CD45-positiven Zellen, angefärbt wurde das Zytoplasma (*Abb. 6A, B*, Seite 74)

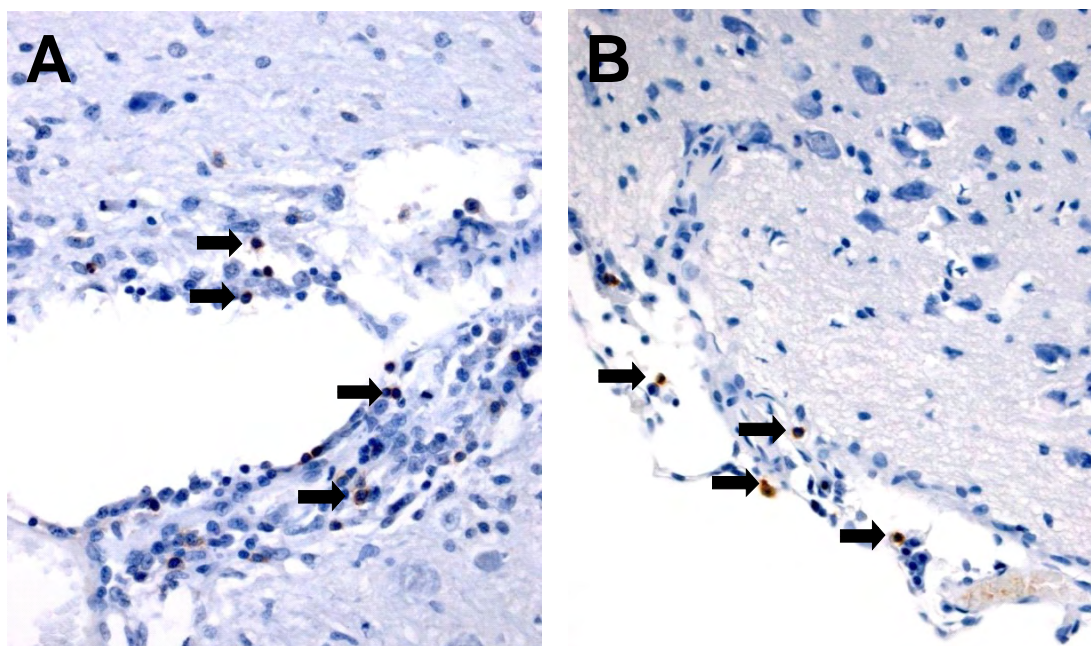
Bei den NBAE-infizierten Tieren ergab sich folgendes Bild:

Bei 4 Tieren (0 NBAE.2, 0 NBAE.3, VI NBAE.2, X NBAE.4), die keine Infiltrate aufwiesen, aber vermehrt CD45-reaktive Zellen in den Meningen und/oder vereinzelt im Parenchym zeigten, wurden nicht vermehrt angefärbte Zellen gefunden. Bei zwei solcher Tiere lediglich eine erhöhte Anzahl CD8-positiver Zellen in den Meningen (*Abb. 6B*).

Bei zwei Tieren mit Infiltraten (VII NBAE.4 und VII NBAE.7) wurden auch in vier, bzw. einem Infiltrat CD8-positive Zellen detektiert (bis 16,7%) (*Abb. 6A*), bei letzterem fanden sich auch vereinzelt positive Zellen im Parenchym.

Bei den Tieren der Gruppe 19 mit Infiltraten waren die Zellen der Infiltrate komplett CD8-negativ, in drei dieser Fälle waren in den Meningen vermehrt CD8-positive Zellen zu finden. In den beiden Gehirnen der Muttertiere waren 0-33 % der Zellen der Infiltrate CD8-positiv, insgesamt in beiden Fällen circa 10 %. Bei dem Tier, das vermehrt CD45-positive Zellen außerhalb des Gehirngewebes zeigte, waren dort auch vermehrt CD8-positive Zellen zu finden, bei dem anderen Muttertier waren wie auch in der CD45-Immunhistochemie vermehrt angefärbte Zellen im Parenchym, besonders im Bulbus olfactorius und Cortex.

Es konnten trotz mehrerer verwendeter CD4-Antikörper der Firma Serotec und verschiedener Protokolle keine auswertbaren Ergebnisse einer CD4-Immunhistochemie bei dem zur Verfügung stehenden Gewebe erzielt werden. Da die Verteilung der CD8-positiven Zellen jedoch der in der Literatur für BDV-infizierte Ratten beschrieben entspricht, ist nicht anzunehmen, dass es Abweichungen bei der Verteilung der CD4-positiven Zellen gibt.



**Abbildung 6: Immunreaktion (Lymphozyten, CD8-Immunhistochemie)**

**A:** CD8-positive Zellen (Pfeile) im Infiltrat im Stammhirn eines NBAE-infizierten Tieres mit Entzündung (VII NBAE.7; Vergrößerung x150)

**B:** Vermehrt angefärbte Zellen (Pfeile) in der Meninx von Tier IX NBAE.3 (Vergrößerung x150)

#### 4.4.3 Mikroglia/Makrophagen (ED1)

Der hier verwendete Antikörper MCA341R erkennt ein 110 kDa großes Glykoprotein, das überwiegend auf der lysosomalen Membran von Myeloidzellen exprimiert wird. Das Antigen wird von der Mehrzahl der Gewebsmakrophagen und schwach von peripheren Blutgranulozyten exprimiert. ED1 gilt als das Rattenhomolog zum menschlichen CD68.

In jeder Gehirnregion (siehe *Abbildung 2*, Seite 54) wurden die ED1-reaktiven Zellen gezählt und in folgende drei Grade (+ bis +++) eingeteilt. Gezählt wurden ausschließlich Zellen mit eindeutig erkennbarem Zelleib und/oder Zellkern.

Gradeinteilung:

- + : weniger als 10 positive Zellen pro Gesichtsfeld
- ++ : 10 bis 50 positive Zellen pro Gesichtsfeld
- +++ : mehr als 50 positive Zellen pro Gesichtsfeld

Eine besonders ungleichmäßige Verteilung innerhalb einer Region wird in der Tabelle mit einer von-bis-Angabe (Beispiel: +---) deutlich gemacht.

Bei fokaler (fk) Verteilung der ED1-reaktiven Zellen innerhalb einer Gehirnregion erfolgte die Gradeinteilung sowohl außerhalb als auch innerhalb des Fokus (Beispiel: +/-fk++), auch wenn zwar eine fokale Verteilung zu erkennen war, aber die Unterschiede weniger als einen Grad betrug (Beispiel: +/-fk+).

Andere Auffälligkeiten der Färbung sind mit hochgestellten Ziffern, bzw. Fußnoten in *Tabelle 6* aufgeführt.



**Tabelle 6: Befunde der ED1-Immunhistochemie (Mikroglia/Makrophagen)**

Gradeinteilung: + = unter 10 Zellen pro Gesichtsfeld, ++ = 10– 50 Zellen pro Gesichtsfeld, +++ = mehr als 50 Zellen pro Gesichtsfeld

Tier	Bulbus	Cortex	Corpus callosum	Hippocampus	Mittelhirn	Stammhirn	Kleinhirn
<b>Kontrolltiere</b>							
BDV neg Ko 4 Wo	+	+	+	+	+	+	+
BDV neg Ko 6 Wo	+	+	+	+	+	+	+
BDV neg Ko 8 Wo	+	+	+	+	+	+	+
Lewis NL – 1	+	+	+	+	+	+	+
Lewis NL – 2	+	+	+	+	+	+	+
Lewis NL – 3	+	+	+	+	+	+	+
Lewis NL – 4	+	+	+	+	+	+	+
<b>BDV-negative Tiere</b>							
VI NBAE.4	+	+	+	+	+	+	+
VII.8	+	+	+	+	+	+	+
VII.9	+	+	+	+	+	+	+
X NBAE.1	+	+	+	+	+	+	+
X.5	+	+	+	+	+	+	+
12 NBAE.1	+	+	+	+	+	+/fk+	+/fk+
19 NBAE.4	+	+	+	+	+	+	+
<b>BDV-positive NBAE-Tiere</b>							
0 NBAE.1	n.v.	+	+	+/fk++	+	+	+
0 NBAE.2	+	+/fk++	++/fk++	+	+	+	++/fk++
0 NBAE.3	+	+	++	+	<sup>1</sup>	+	+
0 NBAE.4	+-++	+	++	+	+	+	+
0 NBAE.6	+/fk++	+	++	++	++	+/fk++	+
VI NBAE.1	+	+	++	n.v.	<sup>1</sup>	+	+
VI NBAE.2	+	+	++	+/fk++	++	+-++	+/Ma++
VI NBAE.3	++	++/fk++	++	+++	++	++	+/fk++
VII NBAE.1	+	+	+	n.v.	+	+	+/Ma++
VII NBAE.2	+	+	+	+	+	+	+
VII NBAE.3	+	+-++/fk++ <sup>2</sup>	++	+/fk++++	+	+	+/fk++ <sup>3</sup>
VII NBAE.5	n.v.	+/fk++	+	++	++	+	+/Ma++
VII NBAE.6	++	+++	++	n.v.	++	+	+/Ma++
VIII NBAE.3	+	+	++	+	+-++	+	+-++
VIII NBAE.7	++	++	++	++	++	+	+
IX NBAE.3	+	++	++	n.a.	+	+-++	+/Ma++
IX NBAE.4	+	+	+	n.v. <sup>4</sup>	+	+/fk++	+-++
X NBAE.4	++	+++	+++	n.v.	++	++	+/fk++++
11 NBAE.1	+	<sup>4</sup>	+	n.v. <sup>4</sup>	+	+	+/Ma+++
11 NBAE.11	+	+	++	+	+	+	+-++
<b>Tiere mit CD45-positiven Infiltraten</b>							
0.Mu	+-++	+-++/fk++ <sup>2</sup>	+-++/fk++	++/fk+++	+-++/fk+++ <sup>2</sup>	+/fk++++ <sup>2</sup>	+/fk++
VII NBAE.4	+++	++++	++	+++	++	++++	+/Ma++
VII NBAE.7	+++/fk+++ <sup>2</sup>	+++/fk+++ <sup>2</sup>	++/fk+++ <sup>2</sup>	+++	+/fk+++ <sup>2</sup>	++/fk+++ <sup>2</sup>	+
11.Mu	++++	++	+++	+++	n.a.	+/fk++	+
19 NBAE.1	+	<sup>5</sup>	+++	n.v.	+	+	+/fk+
19 NBAE.2	+	+	++	+-++	+	+	+
19 NBAE.3	+	+-++	+++	++	+	+	+-++
19 NBAE.5	+-++	+/fk++ <sup>2</sup>	+	<sup>2</sup>	<sup>2</sup>	<sup>2</sup>	+

**Tabelle 6 (Fortsetzung)**

Abkürzungen: n.v. = nicht vorhanden, n.a. = nicht auswertbar, Ma = im Kleinhirnmark, fk = fokal

Fußnoten: 1: im Bereich der Meninx saumartig mehr positive Zellen

2: Foci besonders im Bereich von gefäßassoziierten Zellinfiltraten

3: außerhalb des Hirngewebes im Bereich der Meningen positive runde bis ovale Zellen ohne Ausläufer mit rundem Kern

4: HC nicht vorhanden, aber ventral des Cc: ++

5: im Bereich von gefäßassoziierten Zellinfiltraten positive runde bis ovale Zellen ohne Ausläufer mit rundem Kern

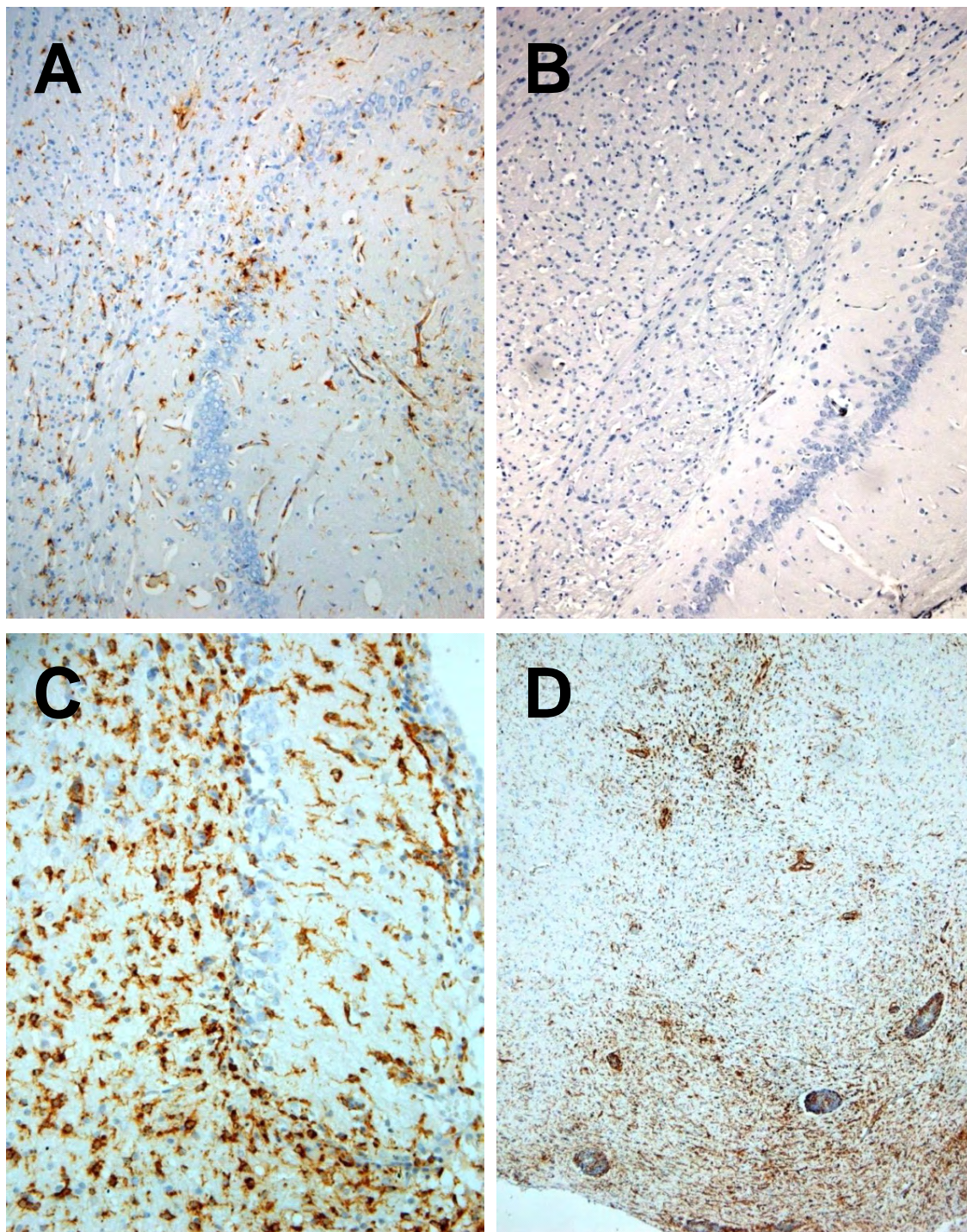
Soweit nicht anders angegeben, wiesen die angefärbten Zellen eine stabförmige oder ovale Form des Zellleibes mit mehr oder weniger ausgeprägten Ausläufern auf und einen kleinen runden bis ovalen Kern (*Abb. 7A, C, Seite 78*). Im Bereich der Meningen außerhalb des Hirnparenchyms und in gefäßassoziierten Zellinfiltraten fanden sich bei zwei Tieren auch lymphozytenähnliche kleine runde bis ovale Zellen mit großem Kern und wenig Zytoplasma, die sich in der Immunhistochemie anfärbten.

Außer kleinen Ungleichmäßigkeiten im Kleinhirn bei zwei Tieren, waren bei den Kontrolltieren, bei den negativen Tieren und bei einem BDV-positiven Tier (VII NBAE.2) kaum angefärbte Zellen im Gehirn vorhanden. In der Regel wurden hier in allen Regionen weniger als drei positive Zellen pro Gesichtsfeld detektiert (*Abb. 7B*).

Bei den BDV-positiven NBAE-Tieren, die keine Entzündung aufwiesen, war eine Erhöhung der Mikroglia/Makrophagen im allgemeinen weniger ausgeprägt (*Abb. 7A*) als bei den Tieren mit Infiltraten (*Abb. 7C, D*). Auch war die Verteilung gleichmäßiger und nur in einzelnen Arealen fokal. Bei den Tieren mit Entzündung waren die Foci meist gefäßassoziiert (*Abb. 7D*).

Bei vielen Rattengehirnen war innerhalb des Kleinhirns vor allem das Mark betroffen, während die anderen Schichten keine oder eine geringe Erhöhung angefärbter Zellen zeigten. Bei besonders vielen Tieren war eine leichte, bei den Tieren mit Infiltraten auch eine starke Mikrogliose im Corpus callosum festzustellen.

Eine besonders starke Reaktion konnte nur bei zwei der BDV-positiven NBAE-Tiere ohne Infiltrate im Corpus callosum, bzw. im Hippocampus beobachtet werden. Bei den Tieren mit Entzündung gab es mehrere Fälle mit besonders deutlicher Erhöhung der anfärbbaren Zellen, bei einem auch im Bulbus olfactorius und bei zahlreichen Tieren im Bereich der Foci/Infiltrate (*Abb. 7D*).



**Abbildung 7: Immunreaktion (Makrophagen/Mikroglia)**

- A:** mittelgradige fokale Erhöhung ED1-positiver Zellen im Hippocampus (0 NBAE.1; Vergrößerung x75)  
**B:** geringe ED1-Expression im Hippocampus und Cortex bei einem Kontrolltier (neg 8Wo; Vergrößerung x75)  
**C:** starke Erhöhung ED1-exprimierender Zellen im Hippocampus eines neugeboren infizierten Tieres mit Entzündung (VII NBAE.4; Vergrößerung x85)  
**D:** stark erhöhte Expression von ED1 im Bereich von Infiltraten im Mittelhirn eines neugeboren infizierten Tieres mit Entzündung (VII NBAE.7; Vergrößerung x50)



## 4.5 Zell- und Gewebsreaktionen

### 4.5.1 Astroglia

Als Marker für Astroglia wurden die Intermediärfilamente GFAP und Vimentin verwendet. Während GFAP fast ausschließlich von reifen und vermehrt von reaktiven Astrozyten exprimiert wird, kommt Vimentin bei unreifen und reaktiven Astrozyten sowie in Endothelzellen vor und beide Filamente werden vermutlich in einer Reifungsphase koexprimiert (Galou *et al.*, 1996; Pixley und de Vellis, 1984; Tapscott *et al.*, 1981).

#### 4.5.1.1 Reife Astrozyten

Bei gleichmäßiger Verteilung der GFAP-positiven Zellen innerhalb einer Lokalisation wurden die GFAP-positiven Zellen (Astrozyten) gezählt und in folgende Grade (+ bis +++) eingeteilt. Dabei wurden ausschließlich Zellen mit eindeutig erkennbarem Zelleib und Zellkern gewertet.

Gradeinteilung:

+	:	weniger als 7 Zellen pro Gesichtsfeld
++	:	7 – 20 Zellen pro Gesichtsfeld
+++	:	mehr als 20 Zellen pro Gesichtsfeld

Eine besonders ungleichmäßige Verteilung wird in der Tabelle mit einer von-bis-Angabe (Beispiel: +---) deutlich gemacht.

Im Bulbus olfactorius war die Expression von GFAP bei betroffenen Tieren nicht in allen Schichten erhöht. In der Regel waren das Stratum filare und das Stratum plexiforme externum nicht wesentlich betroffen, die Hochregulierung aber im Stratum glomerulosum und im Stratum granulosum internum deutlich.

Andere Auffälligkeiten der Färbung sind mit hochgestellten Ziffern, bzw. Fußnoten in *Tabelle 7* aufgeführt.

**Tabelle 7: GFAP-exprimierende Zellen**

Gradeinteilung: + = unter 7 Zellen pro Gesichtsfeld, ++ = 7–20 Zellen pro Gesichtsfeld, +++ = mehr als 20 Zellen pro Gesichtsfeld

Tier	Bulbus	Cortex <sup>1</sup>	Corpus callosum	Hippo-campus <sup>2</sup>	Mittel-hirn	Stamm-hirn	KH Mark	KH Körn.	KH Rest
<b>Kontrolltiere</b>									
BDV neg Ko 4 Wo	+	+	+	+--+	+	+	+--+	+	+
BDV neg Ko 6 Wo	+	+	n.a.	+--+	n.a.	+	+--+	+	+
BDV neg Ko 8 Wo	n.v.	+	+	+--+	+	+	+--+	+	+
Lewis NL – 1	+	+	+	+--+	+	+	+--+	+	+
Lewis NL – 2	+	+	+	+--+	+	+	+	+	+
Lewis NL – 3	n.v.	+	+	+	+	+	+--+	+	+
Lewis NL – 4	+	+ / +++	+	+--+	+	+	+--+	+	+
<b>BDV-negative Tiere</b>									
VI NBAE.4	+	+ / +++	++	+ / +++	+	+--+	+--+	++	+
VII.8	+-----	+ / +++	+++	+++	++	n.v.	++	+--+	+--+
VII.9	+	+ / +++	++	+ / +++	+	+--+	++	+	+
X NBAE.1	+--+	+ / +++	+++	++	+	++	++	++	++
X.5	+	+	+--+	+	+	+	+--+	+	+
12 NBAE.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19 NBAE.4	n.v.	+	+	+	n.v.	n.v.	+	+	+
<b>BDV-positive NBAE-Tiere</b>									
0 NBAE.1	n.v.	+ / +++	+ -++	+++ / +++ <sup>3</sup>	+	+	++	+	+
0 NBAE.2	+--+	+ / +++	+++	++	++	++	++	++	+
0 NBAE.3	+	+ / +++	+++	++	++	++	++	++	+
0 NBAE.4	+--+	+--+	++	++	++	++	+--+	+--+	+--+
0 NBAE.6	+--+	+++ / +++	+++	+++ / +++	+++	++	+++	+--+	+--+
VI NBAE.1	+--+	+ / +++	++	++	+	+--+	++	+--+	+--+
VI NBAE.2	+--+	+++ / +++	++	+++	+++	+++	+++	++	++
VI NBAE.3	++	+ / +++	+++	++	n.v.	++	+++	+--+	+--+
VII NBAE.1	+--+	+++ / +++	+++	+++	++	+++	+++	++	++
VII NBAE.2	+--+	+ / +++	++	++	+	+--+	+--+	++	+
VII NBAE.3	+-----	+ / +++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
VII NBAE.5	n.v.	+++ / +++	+++	+++ / +++	++	+++	+++	++	++
VII NBAE.6	+-----	+ / +++	+++	+++	++	++	++	++	+
VIII NBAE.3	+--+	+ / +++	++	++	+	+	+--+	++	+
VIII NBAE.7	+	+++ / +++	+++	++	++	++	++	++	+
IX NBAE.3	+	+ / +++	++	+	+	+	+--+	+	+
IX NBAE.4	+--+	+++ / +++	+++	++	+--+	++	+++	+--+	+--+
X NBAE.4	+--+	+ / +++	+++	n.v.	++	+++	+++	++	+
11 NBAE.1	+	+	+--+	n.v.	+	+	+	+	+
11 NBAE.11	+	+ / +++	+++	+++ / +++	+--+	++	+++	+--+	+--+
<b>Tiere mit CD45-positiven Infiltraten</b>									
0.Mu	+	+	+	++	+	+	+	+	+
VII NBAE.4	+-----	+++ / +++	+++	+++	++	+++	+++	++	++
VII NBAE.7	+-----	+++ / +++ <sup>3</sup>	+++	+++	+	++	++	+--+	+--+
11.Mu	+	+	+--+	++	+	+	+--+	+	+
19 NBAE.1	+	+	+--+	n.v.	+	+	+--+	+	+
19 NBAE.2	+	+ / +++	++	++	+	+	+--+	+	+
19 NBAE.3	+	+ / +++	++	+++	+	+--+	+--+	+	+
19 NBAE.5	+	+ / +++	++	+++ / +++	+	+	+--+	+	+

**Tabelle 7 (Fortsetzung)**

Abkürzungen: Körn. = Körnerschicht, Rest = Purkinjezell- und Molekularschicht, n.a. = nicht auswertbar, n.v. nicht vorhanden

Fußnoten: 1: die Angabe nach dem Schrägstrich steht für das Areal dorsal und/oder caudal des Corpus callosum, in dem oft eine besonders starke Expression zu finden war

2: die Angabe nach dem Schrägstrich steht für das Areal in der Mitte des sagittalen Hippocampusanschnitts, in dem oft eine besonders starke Expression zu finden war

3: ein Focus mit erhöhter GFAP-Expression

Die positiven Zellen wiesen eine sternförmige Morphologie mit mehr oder weniger ausgeprägten Ausläufern auf, bei denen das Zytoplasma braun angefärbt war (*Abb. 8A, E*, Seite 82).

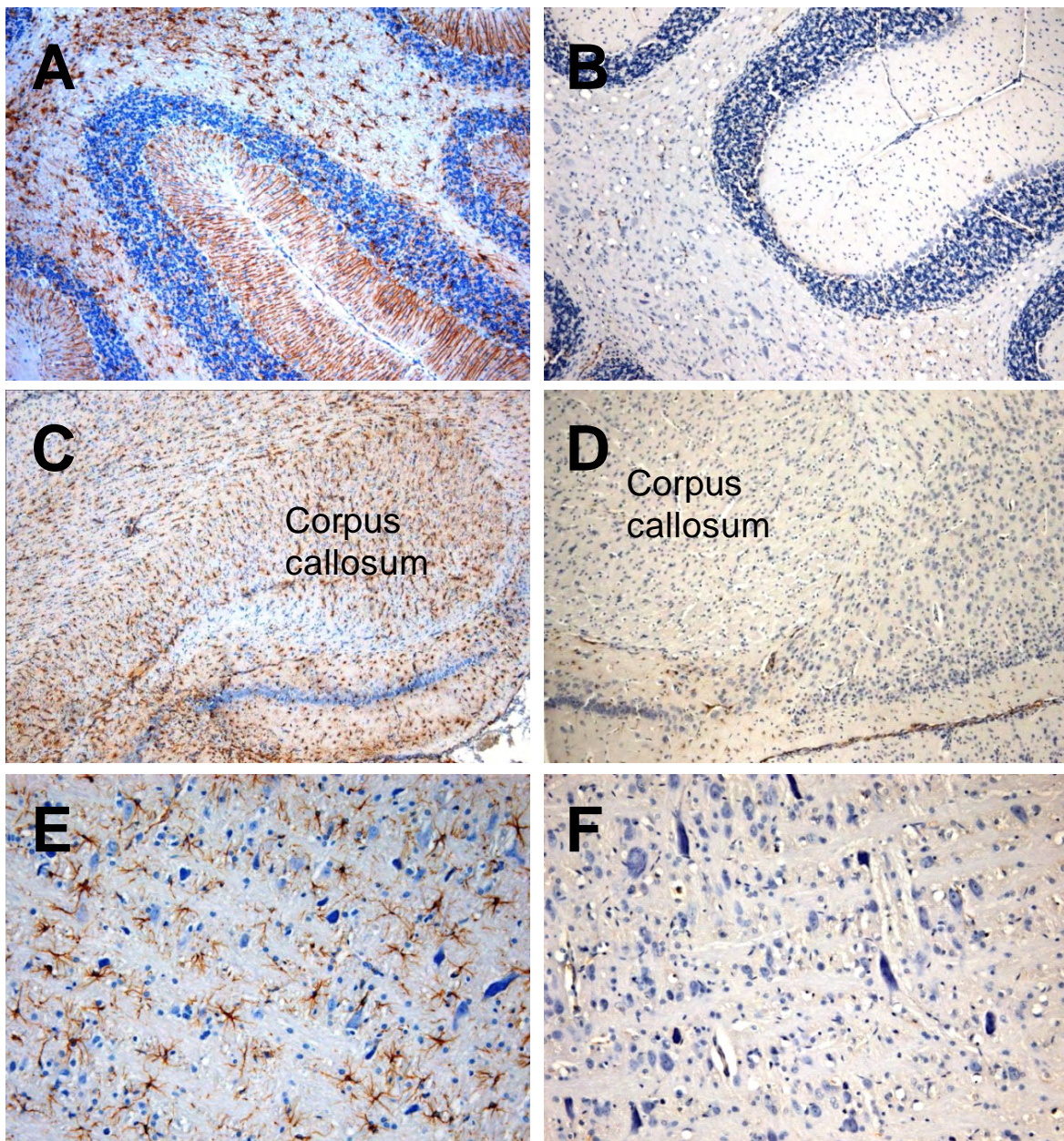
Die Kontrolltiere und drei der BDV-negativen Tiere zeigten kaum angefärbte Zellen in allen Arealen (*Abb. 8B, D, F*), etwas mehr GFAP-exprimierende Zellen (teilweise mehr als sieben angefärbte Zellen pro Gesichtsfeld) waren hier nur im Hippocampus und im Kleinhirnmak, bei Tier 19 NBAE.4 auch im Cortex zu finden.

Die übrigen vier der sieben BDV-negativen Tiere zeigten eine mittelgradig erhöhte Zahl GFAP-positiver Zellen, nur in zwei Arealen eines Tieres (VII.8) wurde eine starke Erhöhung festgestellt.

In der Gruppe der experimentell infizierten BDV-positiven NBAE-Ratten zeigte ein Tier (11 NBAE.1) nur im Corpus callosum eine geringgradige Erhöhung positiver Zellen, zwölf Tiere zeigten eine starke Expression mit durchschnittlich mehr als 20 Zellen pro Gesichtsfeld in mehr als zwei der bewerteten Areale und acht Tiere eine mittelgradige Erhöhung positiver Zellen (*Abb. 8A, C, E*).

Gebiete, in denen sich besonders häufig eine starke Expression von GFAP zeigte, waren der Cortex, insbesondere im ventralen Bereich, das Kleinhirnmak, das Corpus callosum und der Hippocampus. Im Stammhirn waren die Schwankungen zwischen den Tieren größer, in den übrigen Schichten des Kleinhirns wurden in keinem Fall mehr als durchschnittlich 50 Zellen pro Gesichtsfeld erreicht.

Unter den Tieren mit Infiltraten wies ein Tier (0.Mu) nicht mehr GFAP-positive Zellen auf als die Kontrolltiere. Nur zwei Tiere (VII NBAE.4 und VII NBAE.7) zeigten eine starke Expression mit durchschnittlich mehr als 20 Zellen pro Gesichtsfeld in mehr als zwei der bewerteten Areale. Bei fünf Ratten war im Gehirn eine gering- bis mittelgradige Erhöhung GFAP-reaktiver Zellen zu beobachten. Auch hier waren besonders der ventrale Cortex, das Corpus callosum, der Hippocampus und das Kleinhirnmak betroffen.



**Abbildung 8: Gewebsreaktion (GFAP-Immunhistochemie)**

- A:** mittelgradige Erhöhung GFAP-positiver Zellen im Kleinhirn des neugeboren infizierten Tieres VII NBAE.1 (Vergrößerung x60)
- B:** nur vereinzelt GFAP-positive Zellen im Kleinhirn eines Kontrolltieres (Lewis NL-2; Vergrößerung x60)
- C:** hochgradige Erhöhung der GFAP-Expression im Corpus callosum und Hippocampus des neugeboren infizierten Tieres VII NBAE.3 (Vergrößerung x60)
- D:** geringe GFAP-Expression im Corpus callosum eines Kontrolltieres (Lewis NL-1; Vergrößerung x 60)
- E:** typische Morphologie aktivierter Astrozyten im Stammhirn des neugeboren infizierten Tieres VII NBAE.3 (Vergrößerung x100)
- F:** keine vermehrte GFAP-Expression im Stammhirn eines Kontrolltieres (Lewis NL-2; Vergrößerung x115)

#### 4.5.1.2 Unreife und reaktive Astrozyten und Endothelzellen

Da Vimentin auch von Endothelzellen exprimiert wird, werden die Gefäßendothelien und Ventrikelauskleidungen mit dem Anti-Vimentin-Antikörper angefärbt. Diese wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Bei gleichmäßiger Verteilung der Vimentin-positiven Zellen innerhalb einer Lokalisation wurden die Vimentin-positiven Zellen in drei repräsentativen Gesichtsfeldern bei 400facher Vergrößerung gezählt, der Mittelwert bestimmt und in folgende Grade (+ bis +++) eingeteilt. Dabei wurden ausschließlich Zellen mit eindeutig erkennbarem Zelleib und Zellkern gewertet.

Gradeinteilung:

- + : weniger als 8 Zellen pro Gesichtsfeld
- ++ : 8 – 20 Zellen pro Gesichtsfeld
- +++ : mehr als 20 Zellen pro Gesichtsfeld oder wenn das Neuropil in diesem Areal komplett braungefärbt ist und einzelne Zellen nicht eindeutig abzugrenzen sind

Eine besonders ungleichmäßige Verteilung wird in der Tabelle mit einer von-bis-Angabe (Beispiel: +---) deutlich gemacht.

Im Bulbus olfactorius war eine erhöhte Expression vor allem im Stratum granulosum internum festzustellen, während die äußeren Schichten nicht oder kaum betroffen waren. Andere Auffälligkeiten der Färbung sind mit hochgestellten Ziffern, bzw. Fußnoten in *Tabelle 8* aufgeführt.



**Tabelle 8: Vimentin-exprimierende Zellen**

Gradeinteilung: + = unter 8 Zellen pro Gesichtsfeld, ++ = 8–20 Zellen pro Gesichtsfeld, +++ = mehr als 20 Zellen pro Gesichtsfeld

Tier	Bulbus	Cortex <sup>1</sup>	Corpus call.	Hippo- camp. <sup>2</sup>	Mittel- hirn	Stamm- hirn	Kleinhirn	
							Mark	Rest
Kontrolltiere								
BDV neg Ko 4 Wo	+	+	+	+	+	+	+++	+
BDV neg Ko 6 Wo	+	+	n.a.	+	n.a.	+	+++	+
BDV neg Ko 8 Wo	+	+	+	+	+	+	+++	+
Lewis NL – 1	+	+	+	+	+	+	+++	+
Lewis NL – 2	+	+	+	+	+	+	+++	+
Lewis NL – 3	n.v.	+	+	+	+	+	+++	+
Lewis NL – 4	+	+ / ++	+	+	+	+	+++	+
BDV-negative Tiere								
VI NBAE.4	+++	+ / ++	++	+	+	+	++	+
VII.8	++++ <sup>3</sup>	+ / ++	++	+	+	n.v.	+++	+
VII.9	+	+	+++	+	+	+	+++	+
X NBAE.1	+++	+	++	+	+	+	+++	+
X.5	+	+	n.v.	n.v.	+	+	+++	+
12 NBAE.1	n.v.	+	+	+	+	+	+	+
19 NBAE.4	n.v.	+	+	+	n.v.	n.v.	+++	+
BDV-positive NBAE-Tiere								
0 NBAE.1	n.v.	+ / ++	+++	+ / +++	+	+	+++ + ++	+
0 NBAE.2	+++	+ / ++	+++	+ / ++	+	+	+++ + ++	+++
0 NBAE.3	+++	+	++	+	+	+	+++	+
0 NBAE.4	+	+ / ++	++	+++	+	+	+++ + ++	+
0 NBAE.6	+++	+ / ++	++	+ / ++	+	+	+++ + ++	+
VI NBAE.1	+++	++ <sup>3</sup>	+++	n.v.	+	+	+++ + ++	+++
VI NBAE.2	+++ + ++	++ / +++	+++	+++	+	+	+++	+++
VI NBAE.3	+++	++ / +++	+++	+++	+	+	+++	+++
VII NBAE.1	+	++ / +++	+++	+++	+	+	+++ + ++	+
VII NBAE.2	+	+	++	+	+	+	+++	+
VII NBAE.3	+++	+ / +++	+++	++ / +++	+	+	++	+
VII NBAE.5	n.v.	+ / ++	+++	+ / +++	+	+	+++ + ++	+++
VII NBAE.6	+++ + ++	+ / ++	+++	+ / +++	+	+	+++	+
VIII NBAE.3	+	+	+++	+	+	+	+++	+
VIII NBAE.7	+	+ / ++	+++	+ / +++	+	+	+++	+
IX NBAE.3	+++	+	++	+	+	+	+++	+
IX NBAE.4	+	++	++	n.v.	+	+	+++	+
X NBAE.4	+	++	++	++	+	+	++	+
11 NBAE.1	+ <sup>4</sup>	+	+	n.v.	+	+	+++	+++
11 NBAE.11	+	+ / ++	++	n.v.	+	+	+++	+
Tiere mit CD45-positiven Infiltraten								
0. Mu	+++	+++ <sup>5</sup>	++	+++	+	+++ <sup>5</sup>	+++	+
VII NBAE.4	+++ + ++	+++ + ++ <sup>5</sup>	+++	+++ + ++	+	+ <sup>5</sup>	+++	+++
VII NBAE.7	+++ + ++	++ <sup>5</sup>	+++ + ++	+++	+	+ <sup>5</sup>	++	+
11. Mu	+	++	++	n.v.	+	+ <sup>6</sup>	+++	+
19 NBAE.1	+	+ / ++	++	n.v.	+	+	+++	+
19 NBAE.2	+	+ / ++	++	++	+	+	+++	+
19 NBAE.3	+	+ / ++	++	++	+	+	+++	+
19 NBAE.5	+	+	++	+	+	+	+++	+

**Tabelle 8 (Fortsetzung)**

Abkürzungen: call. = callosum, Hippocamp. = Hippocampus, Rest = Körnerzell-, Pukinjezell- und Molekularschicht des KH, n.a. = nicht auswertbar, n.v. = nicht vorhanden

Fußnoten: 1: die Angabe nach dem Schrägstrich steht für das Areal dorsal und/oder caudal des Corpus callosum, in dem oft eine besonders starke Expression zu finden war

2: die Angabe nach dem Schrägstrich steht für das Areal in der Mitte des sagittalen Hippocampusanschnitts, in dem oft eine besonders starke Expression zu finden war

3: streifenförmiger Focus

4: nur das Stratum filare vorhanden

5: Foci in gefäßassoziierten Infiltraten, auch runde bis ovale Zellen ohne Ausläufer

6: in Stammhirn ein zellreiches gefäßassoziiertes Infiltrat mit wenigen runden bis ovalen Zellen ohne Ausläufer

Zellen, die in der Immunhistochemie eine Anfärbung zeigten, wiesen eine sternförmige Morphologie mit mehr oder weniger ausgeprägten Ausläufern auf (*Abb. 9A, C, E*, Seite 87). Bei fünf der Tiere mit Infiltraten kamen in gefäßassoziierten Zellansammlungen auch Zellen mit lymphozytentypischer Morphologie vor.

Bei den Kontrolltieren und drei der BDV-negativen Tiere zeigten sich in keinem Areal außer im Kleinhirnmantel mehr als 8 positive Zellen pro Gesichtsfeld (*Abb. 9B, D, F*). Nur bei Tier 19 NBAE.4 war (wie schon bei der GFAP-Immunhistochemie) eine leichte Erhöhung Vimentin-positiver Zellen im Cortex zu erkennen.

Bei den übrigen vier der BDV-negativen NBAE-Tiere war die Vimentin-Expression verglichen mit den Kontrolltieren im Bulbus olfactorius, ventral im Cortex und /oder im Corpus callosum leicht erhöht.

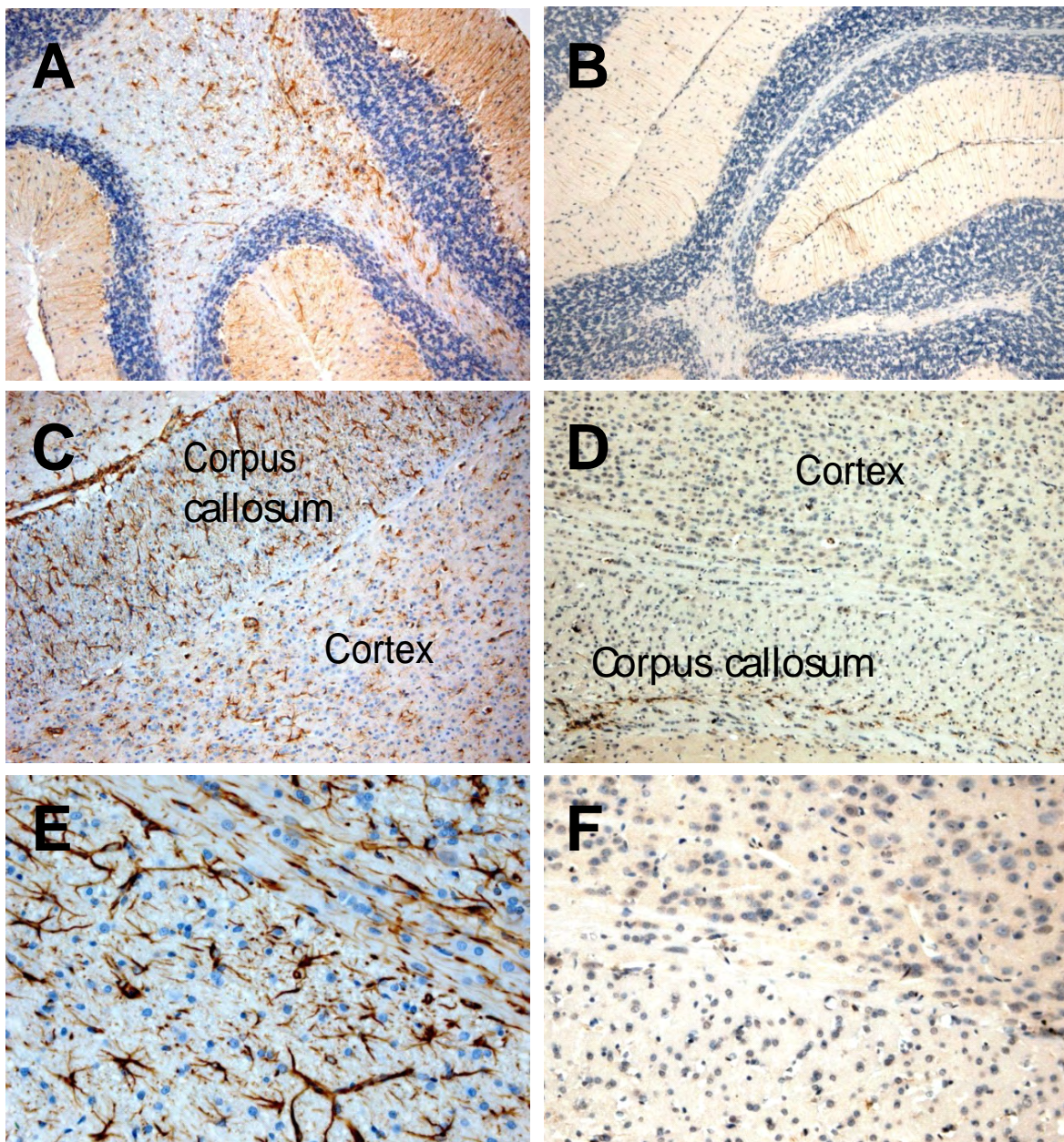
Unter den BDV-positiven NBAE-Ratten zeigte sich in sechs Fällen eine leichte Erhöhung der Zahl Vimentin-exprimierender Zellen in ein oder zwei Arealen. Bei vier Tieren wurde eine mäßige Erhöhung mit mehr als zwei betroffenen Arealen detektiert und bei zehn Tieren war eine stark vermehrte Anzahl positiver Zellen mit mehr als zwei betroffenen Arealen und starker Expression in mehr als einem Areal festzustellen.

Bei den Tieren mit Infiltraten gab es zwei Fälle mit leichter Erhöhung in weniger als drei Arealen, drei Ratten mit mehr als zwei Arealen mit mittelgradiger Erhöhung angefärbter Zellen und drei Fälle mit besonders vielen Vimentin-positiven Zellen, also mehr als durchschnittlich 20 positive Zellen in mehr als einem Gehirnabschnitt.

Bei drei der Tiere mit Infiltraten wurden im Cortex und im Stammhirn gefäßassoziierte Foci Vimentin-positiver Zellen detektiert, meist zusätzlich mit Zellen, die morphologisch Lymphozyten ähnelten. Bei einem Tier (11.Mu) war nur ein solcher Focus im Stammhirn vorhanden.

In keinem Fall waren im Mittelhirn mehr als durchschnittlich acht Zellen pro Gesichtsfeld zu finden, nur bei einem Tier wurde abgesehen von gefäßassoziierten Foci eine leichte Erhöhung positiver Zellen im Stammhirn beobachtet. Die meist betroffenen Gebiete waren der Cortex, insbesondere im Bereich des Cingulums, das Corpus callosum und der Hippocampus. Im Kleinhirnmark war in einigen Fällen eine vermehrte Anzahl positiver Zellen im Verhältnis zu den Kontrolltieren, besonders bei den BDV-positiven Tieren zu finden. Der Bulbus olfactorius und die übrigen Kleinhirnschichten zeigten nur in einigen Fällen vermehrt angefärbte Zellen.





**Abbildung 9: Gewebsreaktion (Vimentin-Immunhistochemie)**

- A:** Erhöhung Vimentin-positiver Zellen im Kleinhirn des neugeboren infizierten Tieres VII NBAE.3 (Vergrößerung x60)
- B:** Kleinhirn eines Kontrolltieres (neg 4Wo) in der Vimentin-Immunhistochemie (Vergrößerung x60)
- C:** starke Erhöhung der Vimentin-Expresson im Cortex und Corpus callosum des neugeboren infizierten Tieres VII NBAE.3 (Vergrößerung x60)
- D:** Corpus callosum und Cortex eines Kontrolltieres (Lewis NL-2; Vergrößerung x60)
- E:** aktivierte, Vimentin-positive Astrozyten im Corpus callosum eines Tieres mit leichter Entzündung (19 NBAE-1; Vergrößerung x100)
- F:** Corpus callosum und Cortex eines Kontrolltieres in der Vimentin-Immunhistochemie (Lewis NL-2; Vergrößerung x100)

#### 4.5.2 Neuronen

Der verwendete Antikörper markiert die 70 kDa und 200 kDa großen Polypeptide des Neurofilaments. Neurofilament wird im Gehirn ausschließlich von Neuronen exprimiert und gilt daher als spezifischer Marker für diesen Zelltyp.

Da bei der Darstellung des Neurofilaments Fasern angefärbt werden, von denen das gesamte Neuropil mehr oder weniger durchzogen ist, und daher einzelne exprimierende Zellen nicht ausgemacht werden können (*Abb. 10*, Seite 91) und außerdem die Intensität der Färbung variiert, war eine vergleichende oder quantitative Auswertung der Neurofilament-Expression nicht möglich.

Insgesamt lässt sich sagen, dass sich keine deutlichen Unterschiede in der Expression des Neurofilaments in den verschiedenen Arealen des Gehirns feststellen lassen (*Abb. 10*).

Allerdings fielen bei der Auswertung einiger Schnitte der NBAE-infizierten Tiere circa zellkerngroße runde deutlich braune Anfärbungen auf, die bei den Kontrolltieren und den BDV-negativen Tieren nicht vorkamen und als Axonschwellungen angesprochen werden konnten (*Abb. 10B, C, Pfeile*). Diese traten bei den betroffenen Tieren vermehrt im Cortex, Corpus callosum und Hippocampus und ganz vereinzelt in Mittelhirn und Stammhirn auf.

Die je Schnitt in den angegebenen Regionen quer angeschnittenen geschwollenen Axone sowie sonstige Auffälligkeiten werden in *Tabelle 9* aufgeführt.

**Tabelle 9: Neurofilament-exprimierende Zellen**

Anzahl der quer angeschnittenen geschwollenen Axone in drei Gehirnregionen

Tier	Cortex	Corpus c.	Hippoc.	Anmerkungen
<b>Kontrolltiere</b>				
BDV neg Ko 4 Wo	0	0	0	
BDV neg Ko 6 Wo	0	0	0	
BDV neg Ko 8 Wo	0	0	0	
Lewis NL – 1	0	0	0	
Lewis NL – 2	0	0	0	
Lewis NL – 3	0	0	0	
Lewis NL – 4	0	0	0	
<b>BDV-negative Tiere</b>				
VI NBAE.4	0	0	0	
VII.8	n.a.	0	n.v.	
VII.9	0	0	0	
X NBAE.1	0	0	0	
X.5	0	0	0	
12 NBAE.1	0	0	0	
19 NBAE.4	0	0	0	
<b>BDV-positive NBAE-Tiere</b>				
0 NBAE.1	0	0	0	
0 NBAE.2	6	2	0	Teilweise handelt es sich um angeschnittene Zellen mit angeschnittenem Kern mit Neuronenmorphologie, bei denen das Zytoplasma geschwollen scheint und dunkelbraun angefärbt ist
0 NBAE.3	11	3	1	
0 NBAE.4	5	0	0	
0 NBAE.6	23	2	1	
VI NBAE.1	5	1	n.v.	
VI NBAE.2	6	0	0	
VI NBAE.3	2	0	n.v.	
VII NBAE.1	4	2	1	
VII NBAE.2	0	0	0	
VII NBAE.3	10	0	0	
VII NBAE.5	5	1	0	
VII NBAE.6	6	1	1	
VIII NBAE.3	n.a.	0	0	
VIII NBAE.7	6	0	6	
IX NBAE.3	3	1	2	
IX NBAE.4	0	0	n.v.	
X NBAE.4	15	10	n.v.	
11 NBAE.1	0	0	n.v.	
11 NBAE.11	n.a.	0	1	
<b>Tiere mit CD45-positiven Infiltraten</b>				
0. Mu	17	0	6	Teilweise handelt es sich um angeschnittene Zellen mit angeschnittenem Kern mit Neuronenmorphologie, bei denen das Zytoplasma geschwollen scheint und dunkelbraun angefärbt ist

**Tabelle 9 (Fortsetzung)**

<b>Tier</b>	<b>Cortex</b>	<b>Corpus c.</b>	<b>Hippoc.</b>	<b>Anmerkungen</b>
VII NBAE.4	16	7	15	Im Cortex befinden sich 10 der Axonschwellungen in der Nähe eines gefäß-assoziierten Infiltrats
VII NBAE.7	1	0	0	
11.Mu	2	0	0	
19 NBAE.1	0	2	n.v.	
19 NBAE.2	0	0	0	
19 NBAE.3	0	0	0	
19 NBAE.5	2	0	0	

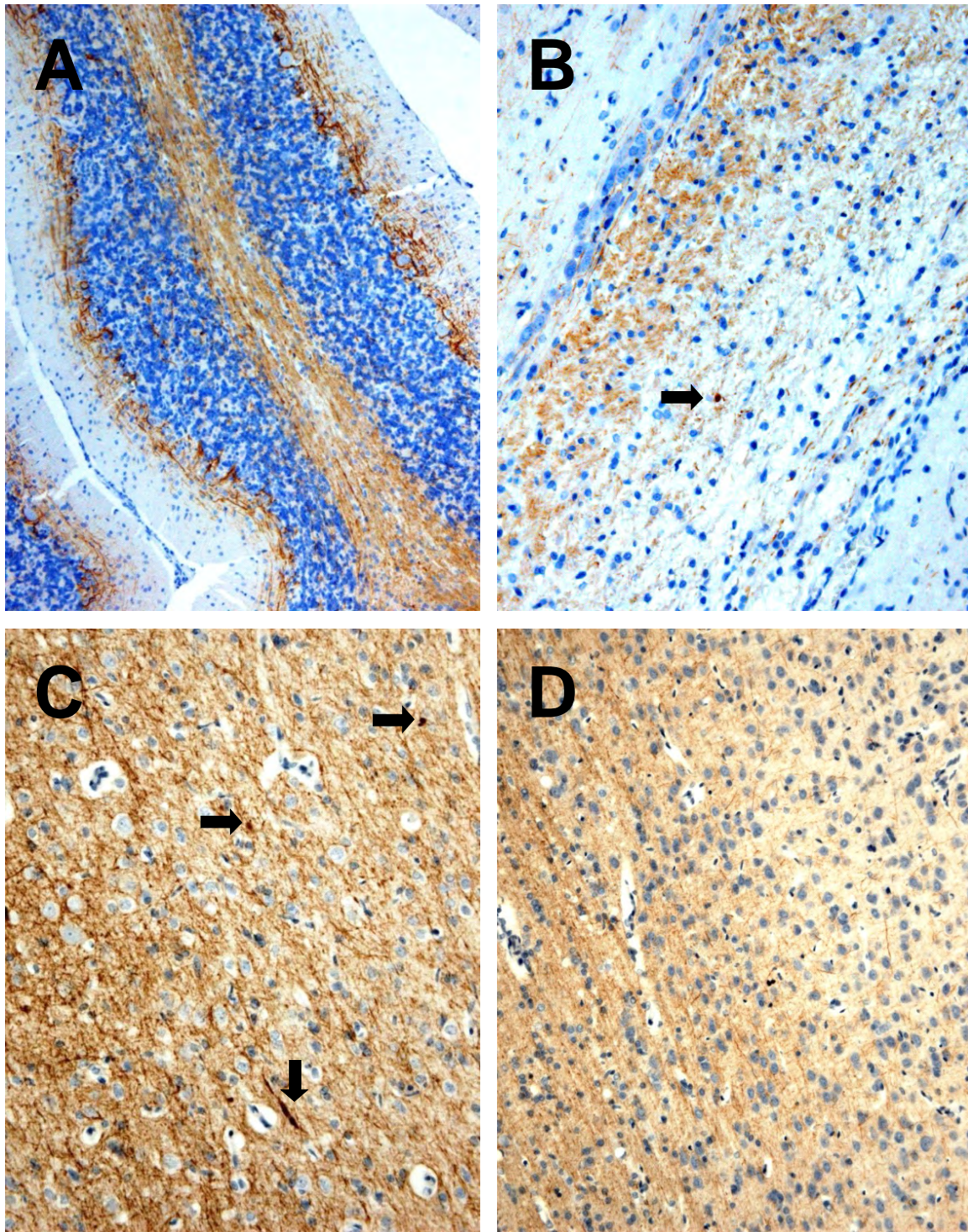
Abkürzungen: c. = callosum, Hippoc. = Hippocampus, n.a. = nicht auswertbar, n.v. = nicht vorhanden

Von den 20 BDV-positiven NBAE-Tieren wurde bei fünf der Tiere keine Axonschwellung detektiert, wobei hier bei drei Tieren je eine Region nicht vorhanden oder nicht auswertbar war. 15 Ratten wiesen in den Gehirnschnitten je 1-25 der geschwollenen Neurofilament-positiven Axone auf, bei vier von diesen waren es in einem oder zwei Arealen mehr als zehn. Bei fünf Tieren traten diese in allen drei untersuchten Regionen auf, bei fünf in zwei und ebenfalls bei fünf nur in einem Areal, wobei auch hier bei drei Tieren je eine Region fehlte oder nicht auswertbar war. In allen positiven Fällen war der Cortex betroffen (einmal nicht auswertbar).

Bei den Tieren mit Infiltraten waren zwei Tiere frei von Axonschwellungen in der Neurofilament-Immunhistochemie. In fünf Fällen waren 1-28 Axonschwellungen zu detektieren. Bei zwei Tieren (0.Mu und 0 NBAE.2) war außerdem das gesamte Zytoplasma von Zellen mit Neuronenmorphologie dunkelbraun gefärbt.

Tier VII NBAE.4 zeigte die meisten Axonschwellungen aller untersuchter Tiere und hatte, was die Verteilung dieser angeht, außerdem eine weitere Auffälligkeit. Im Cortex waren zehn der gezählten quergeschnittenen Axone fokal in direkter Nähe eines Gefäßes lokalisiert und auch im Hippocampus waren einige der geschwollenen Fortsätze eng beieinander, während in allen anderen Fällen die Axonschwellungen vereinzelt im Gewebe lokalisiert waren.





**Abbildung 10: Gewebsreaktion (Neurofilament-Immunhistochemie)**

**A:** Neurofilament-positive (braun) Neurone der Purkinje-Zellschicht (verminderte Zellzahl) im Kleinhirn von Tier VII NBAE.1 (Vergrößerung x75)

**B:** Axonschwellung (Pfeil) im Corpus callosum eines 4 Wochen alten Tieres mit leichter Entzündung (19 NBAE-1; Vergrößerung x100)

**C:** quer (horizontale Pfeile) und längs (vertikaler Pfeil) angeschnittene geschwollene Axone im Cortex von Tier 0 NBAE.3 (Vergrößerung x100)

**D:** keine geschwollene Axone im Cortex eines Kontrolltieres (Lewis NL-2; Vergrößerung x100)

#### **4.6 Vergleich mehrerer Färbungen in der Übersicht**

Um die Ergebnisse der verschiedene Färbungen besser vergleichen zu können und eventuelle Zusammenhänge zu erkennen, wurde für die Regionen, in denen die stärksten Veränderungen festgestellt wurden, Cortex und Hippocampus, jeweils eine Tabelle erstellt, in der sieben Parameter in einer Übersicht dargestellt sind.

Außerdem sind in *Tabelle 12* von allen Tieren die Ergebnisse der Färbungen im gesamten Gehirn zusammengefasst.

**Tabelle 10: Übersicht: Befunde im Cortex**

Die Gradeinteilung bei ED1, GFAP und Vimentin entspricht der bei den jeweiligen Ergebnislisten angegebenen.

Tier	BDV [%]	Entzündung				Filamente		
		In- filtrate (HE)	In- filtrate (CD45)	CD45+ im Gewebe	ED1	GFAP	Vim.	AS (NF)
Kontrolltiere								
BDV neg Ko 4 Wo	0	-	-	-	+	+	+	0
BDV neg Ko 6 Wo	0	-	-	-	+	+	+	0
BDV neg Ko 8 Wo	0	-	-	-	+	+	+	0
Lewis NL – 1	0	-	-	-	+	+	+	0
Lewis NL – 2	0	-	-	-	+	+	+	0
Lewis NL – 3	0	-	-	-	+	+	+	0
Lewis NL – 4	0	-	-	-	+	+/++	+/++	0
BDV-negative Tiere								
VI NBAE.4	0	-	-	-	+	+/++	+/++	0
VII.8	0	-	-	-	+	+/++	+/++	n.a.
VII.9	0	-	-	-	+	+/++	+	0
X NBAE.1	0	-	-	-	+	+/++	+	0
X.5	0	-	-	-	+	+	+	0
12 NBAE.1	0	-	-	-	+	+	+	0
19 NBAE.4	0	+	-	-	+	+	+	0
BDV-positive NBAE-Tiere								
0 NBAE.1	25	-	-	-	+	+/++	+/++	0
0 NBAE.2	25	-	-	-	+/fk++	+/+++	+/++	6
0 NBAE.3	28	-	-	+	+	+/+++	+	11
0 NBAE.4	40	-	-	-	+	+++++	+/++	5
0 NBAE.6	55	-	-	-	+	++/+++	+/++	23
VI NBAE.1	22	-	-	-	+	+/++	++	5
VI NBAE.2	23	-	-	-	+	++/+++	++/+++	6
VI NBAE.3	15	-	-	-	++/fk++	+ /+++	++/+++	2
VII NBAE.1	20	-	-	-	+	++/+++	++/+++	4
VII NBAE.2	<1	-	-	-	+	+/++	+	0
VII NBAE.3	25	-	-	-	+++/fk++	+/+++	+/+++	10
VII NBAE.5	40	-	-	-	+/fk++	++/+++	+/++	5
VII NBAE.6	30	-	-	-	++-+++	+/+++	+/++	6
VIII NBAE.3	65	-	-	-	+	+/++	+	n.a.
VIII NBAE.7	25	-	-	-	++	++/+++	+/++	6
IX NBAE.3	50	-	-	-	++	+/++	+	3
IX NBAE.4	35	-	-	-	+	++/+++	++	0
X NBAE.4	38	+	-	-	++-+++	+/+++	++	15
11 NBAE.1	0	-	-	-	+	+	+	0
11 NBAE.11	35	-	-	-	+	+/++	+/++	n.a.
Tiere mit CD45-positiven Infiltraten								
0.Mu	35	+	+	-	+++/fk++	+	+++	17
VII NBAE.4	30	+	+	-	++-+++	++/+++	+++++	16
VII NBAE.7	25	+	+	+	++/fk+++	++/+++	++	1
11.Mu	0	+	+	+	++	+	++	2
19 NBAE.1	60	+	+	-	+	+	+/++	0
19 NBAE.2	27	+	+	-	+	+/++	+/++	0

**Tabelle 10 (Fortsetzung)**

Tier	BDV [%]	Entzündung				Filamente		
		In- filtrate (HE)	In- filtrate (CD45)	CD45+ im Gewebe	ED1	GFAP	Vim.	AS (NF)
19 NBAE.3	42	+	+	+	+-++	+ / ++	+ / ++	0
19 NBAE.5	20	+	+	+	+ / fk++	+ / ++	+	2

Abkürzungen: Vim. = Vimentin, AS = Axonschwellungen, NF = Neurofilament, fk = fokal, n.a. = nicht auswertbar



**Tabelle 11: Übersicht: Befunde im Hippocampus**

Die Gradeinteilung bei ED1, GFAP und Vimentin entspricht der bei den jeweiligen Ergebnislisten angegebenen.

Tier	BDV* [%]	Entzündung				Filamente		
		In-filtrate (HE)	In-filtrate (CD45)	CD45+ im Gewebe	ED1	GFAP	Vim.	AS (NF)
Kontrolltiere								
BDV neg Ko 4 Wo	0	-	-	-	+	+-++	+	0
BDV neg Ko 6 Wo	0	-	-	-	+	+-++	+	0
BDV neg Ko 8 Wo	0	-	-	-	+	+-++	+	0
Lewis NL – 1	0	-	-	-	+	+-++	+	0
Lewis NL – 2	0	-	-	-	+	+-++	+	0
Lewis NL – 3	0	-	-	-	+	+	+	0
Lewis NL – 4	0	-	-	-	+	+-++	+	0
BDV-negative Tiere								
VI NBAE.4	0	-	-	-	+	+/++	+	0
VII.8	0	-	-	-	+	+++	+	n.v.
VII.9	0	-	-	-	+	+/++	+	0
X NBAE.1	0	-	-	-	+	++	+	0
X.5	0	-	-	-	+	+	n.v.	0
12 NBAE.1	0	-	-	-	+	+	+	0
19 NBAE.4	0	+	-	-	+	+	+	0
BDV-positive NBAE-infizierte Tiere								
0 NBAE.1	45	-	-	-	+/fk++	++/+++	+/+++	0
0 NBAE.2	27	-	-	-	+	++	+/++	0
0 NBAE.3	50	-	-	+	+	++	+	1
0 NBAE.4	50	-	-	-	+	++	+++	0
0 NBAE.6	70	-	-	-	++	++/+++	+/++	1
VI NBAE.1	60	-	-	-	n.v.	++	n.v.	n.v.
VI NBAE.2	80	-	-	+	+/fk++	+++	+++	0
VI NBAE.3	45	-	-	-	+++	++	+++	n.v.
VII NBAE.1	n.v.	-	-	-	n.v.	+++	+++	1
VII NBAE.2	0	-	-	-	+	++	+	0
VII NBAE.3	65	-	-	-	+/fk++++	+++	++/+++	0
VII NBAE.5	70	-	-	-	++	++/+++	+/+++	0
VII NBAE.6	65	-	-	-	n.v.	+++	+/+++	1
VIII NBAE.3	60	-	-	-	+	++	+	0
VIII NBAE.7	85	-	-	-	++	++	+/+++	6
IX NBAE.3	60	-	-	-	n.a.	+	+	2
IX NBAE.4	78	-	-	-	n.v.	++	n.v.	n.v.
X NBAE.4	43	-	-	-	n.v.	n.v.	++	n.v.
11 NBAE.1	n.v.	-	-	-	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
11 NBAE.11	75	-	-	-	+	+/+++	n.v.	1
Tiere mit CD45-positiven Infiltraten								
0.Mu	10	-	+	-	++/fk+++	++	+++	6
VII NBAE.4	50	+	+	+	+++	+++	+++----	15
VII NBAE.7	80	n.v.	+	+	+++	+++	+++	0
11.Mu	0	+	+	+	+++	++	n.v.	0
19 NBAE.1	n.v.	+	+	-	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
19 NBAE.2	65	-	n.a.	n.a.	+-++	++	++	0

**Tabelle 11 (Fortsetzung)**

Tier	BDV* [%]	Entzündung				Filamente		
		In-filtrate (HE)	In-filtrate (CD45)	CD45+ im Gewebe	ED1	GFAP	Vim.	AS (NF)
19 NBAE.3	75	+	+	+	++	+++	++	0
19 NBAE.5	52	+	+	+	+	++/+++	+	0

Abkürzungen: Vim. = Vimentin, AS = Axonschwellungen, NF = Neurofilament, fk = fokal, n.a. = nicht auswertbar, n.v. = nicht vorhanden

\* = in der Pyramiden-Zellschicht

In *Tabelle 12* wurden für einige Färbungen Parameter erstellt, die die Ergebnisse aller untersuchten Hirnareale zusammenfassen. Im folgenden sind die Definitionen für die in *Tabelle 12* verwendeten Symbole und Abkürzungen aufgeführt:

#### Symptome:

- : keine Verhaltensstörungen oder gestörtes Allgemeinbefinden beobachtet
- + : Verhaltensauffälligkeiten und/oder gestörtes Allgemeinbefinden
- n.t. : wurden nicht untersucht

#### BDV:

- 0 : keine Immunreaktion mit dem Anti-p38-Ak
- +
- ++ : positive Zellen in allen Arealen und in vier oder weniger der Gehirnabschnitte  
Mehr als 20 % (Bo nicht bewertet)
- +++ : positive Zellen in allen Arealen und in mehr als vier der Gehirnabschnitte  
mehr als 20 % (Bo nicht bewertet)

#### ED1:

- +
- ++ : Erhöhung der Zahl positiver Zellen oder Foci in mindestens einem Areal
- +++ : Foci und/oder starke Erhöhung ED1-positiver Zellen in mehr als zwei Arealen

#### GFAP:

- +
- ++ : Zahl positiver Zellen ist in mehr als einem Areal erhöht und in weniger als drei Abschnitten stark erhöht
- +++ : Zahl positiver Zellen ist in mehr als einem Areal erhöht und mehr als zwei Abschnitt stark erhöht

---

Vimentin:

- + : in keinem oder einem Gehirnabschnitt erhöhte Zahl Vimentin-positiver Zellen im Vergleich zu den Kontrolltieren
- ++ : Zahl positiver Zellen ist in mehr als einem Areal erhöht und in weniger als zwei Abschnitten stark erhöht
- +++ : Zahl positiver Zellen ist in mehr als einem Areal erhöht und mehr als einem Abschnitt stark erhöht

Axonschwellungen (AS) in der Neurofilament-Immunhistochemie:

- : keine Axonschwellung in der Neurofilament-darstellenden Färbung gefunden
- + : Axonschwellungen in Cortex, Cc und /oder HC vorhanden

Purkinje-Zelldichte:

- : keine deutliche Verminderung der Zelldichte
- + : deutlich weniger Purkinjezellen als bei den Kontrollen

**Tabelle 12: Gesamtübersicht aller Tiere über die Ergebnisse mehrerer Untersuchungen**

Tier	Alter [d]	Dosis	Symp-tome	BDV	ED1	GFAP	Vim-entin	AS (NF)	PC
<b>Kontrolltiere</b>									
BDV neg Ko 4 Wo	28	-	-	0	+	+	+	-	-
BDV neg Ko 6 Wo	42	-	-	0	+	+	+	-	-
BDV neg Ko 8 Wo	56	-	-	0	+	+	+	-	-
Lewis NL – 1	30	-	-	0	+	+	+	-	-
Lewis NL – 2	30	-	-	0	+	+	+	-	-
Lewis NL – 3	30	-	-	0	+	+	+	-	-
Lewis NL – 4	30	-	-	0	+	+	+	-	-
<b>Negative Tiere</b>									
VI NBAE.4	110	200	n.t.	0	+	++	++	-	-
VII.8	110	-	n.t.	0	+	+++	++	-	-
VII.9	110	-	n.t.	0	+	++	+	-	-
X NBAE.1	90	400	-	0	+	++	++	-	-
X.5	400	-	n.t.	0	+	+	+	-	-
12 NBAE.1	7	500	n.t.	0	++	+	+	-	-
19 NBAE.4	28	1000	-	0	+	+	+	-	-
<b>BDV-positive NBAE-infizierte Tiere</b>									
0 NBAE.1	310	500	+	++	++	++	+++	-	+
0 NBAE.2	310	500	+	++	+++	++	++	+	+
0 NBAE.3	310	500	+	++	++	++	++	+	+
0 NBAE.4	690	500	-	+++	++	++	++	+	+
0 NBAE.6	310	500	+	+++	++	+++	++	+	+
VI NBAE.1	110	200	+	++	++	++	++	+	n.a.
VI NBAE.2	110	200	-	++	++	+++	+++	+	+
VI NBAE.3	110	200	-	++	+++	+++	+++	+	+
VII NBAE.1	110	200	-	++	++	+++	+++	+	+
VII NBAE.2	110	200	-	+	+	++	+	-	-
VII NBAE.3	110	200	-	+++	+++	+++	+++	+	+
VII NBAE.5	110	200	-	+++	++	+++	+++	+	+
VII NBAE.6	110	200	+	++	++	+++	+++	+	+
VIII NBAE.3	450	400	-	+++	++	++	+	-	+
VIII NBAE.7	90	400	+	+++	++	++	+++	+	+
IX NBAE.3	90	400	+	+++	++	++	++	+	+
IX NBAE.4	740	400	+	+++	++	+++	++	-	+
X NBAE.4	90	400	-	++	+++	+++	++	+	+
11 NBAE.1	11	500	n.t.	+	++	+	+	-	-
11 NBAE.11	640	500	+	++	++	+++	++	+	+
<b>Tiere mit CD45-positiven Infiltraten</b>									
0.Mu	105	-	n.t.	++	+++	+	++	+	-
VII NBAE.4	110	200	+	++	+++	+++	+++	+	+
VII NBAE.7	110	200	+	++	+++	+++	+++	+	n.a.
11.Mu	270	-	n.t.	0	+++	++	++	+	-
19 NBAE.1	28	1000	-	+++	++	+	++	+	-
19 NBAE.2	28	1000	-	+++	++	++	++	-	-
19 NBAE.3	28	1000	-	+++	++	++	++	-	-
19 NBAE.5	28	1000	-	++	++	++	+	+	-

Abkürzungen: d = Tage, AS = Axonschwellungen, n.a. = nicht auswertbar, n.t. = nicht getestet

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Infektion mit dem Borna Disease Virus auf das Gehirn von neugeborenen infizierten Ratten untersucht.

Das Virus mit den für ein RNA-Virus untypischen Eigenschaften, dem besonders breiten Wirtsspektrum und der großen Variabilität des Krankheitsverlaufs wirft trotz seiner relativ frühen Identifikation am Anfang des 20. Jahrhunderts immer noch zahlreiche Fragen bezüglich Epidemiologie, Pathogenese und dem zoonotischen Potential auf. Untersuchungen an infizierten Tieren sind nicht nur von Bedeutung, um die natürliche Infektion besser zu verstehen. Tiermodelle mit ihrem unterschiedlichen, aber reproduzierbaren Verlauf und den pathologischen Veränderungen im Gehirn dienen häufig als Modell für verschiedene menschliche Erkrankungen. So spielt die experimentelle Infektion von Nagern mit dem BDV hinsichtlich degenerativer, auf einer entzündlichen Reaktion basierender Erkrankungen eine wichtige Rolle in der Forschung.

Dabei ist die Infektion der Ratte das am besten dokumentierte Modell. Je nach Infektionszeitpunkt und damit dem Immunstatus der Tiere resultiert sie in einer CD8<sup>+</sup>-T-Zell-vermittelten Meningoenzephalitis (immunkompetente Tiere) oder in einer persistierenden Infektion ohne offensichtliche Entzündungsreaktion (immuninkompetente Tiere).

Für die eigenen Untersuchungen standen Gehirne von Lewis Ratten aus dem Friedrich-Loeffler-Institut in Tübingen zur Verfügung, die als Neugeborene aerogen infiziert wurden. Diese Art der Infektion stellt nicht nur einen minimal invasiven Eingriff dar, sie dürfte auch dem Weg der natürlichen Infektion von Pferden und Schafen entsprechen. Die Versuchstiere wurden am Tage der Geburt innerhalb der ersten 18 Stunden infiziert und in verschiedenem Alter zwischen sieben und 690 Tagen getötet. Zusätzlich standen die Gehirne von zwei Muttertieren, Sentinels und Negativkontrollen verschiedenen Alters zur Verfügung.

Bisherige Untersuchungen von neugeborenen infizierten Ratten wurden ausschließlich bei intrazerebral infizierten Tieren durchgeführt. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass durch die intrazerebrale Injektion Noxen in zweierlei Hinsicht gesetzt werden, deren Auswirkungen auf das sich noch entwickelnde Gehirn Neugeborener kaum abgeschätzt werden können. Zum einen ist die mechanische Schädigung durch die Injektionsnadel, zum anderen die Schädigung durch die Deposition des Injektionsvolumens zu beachten. Aus der Literatur (Lenzlinger *et*

*al.*, 2001; Oyesiku *et al.*, 1999; Ray *et al.*, 2002; Rice *et al.*, 2003) ist bekannt, dass solche traumatischen Eingriffe im Gehirn initial zu Veränderungen des zerebralen Metabolismus, der Durchblutung und der Ionen-Homöostase führen und sekundär eine inflammatorische Antwort und destruktive Prozesse verursachen sowie endogene Regenerationsprozesse in Gang setzen.

Insofern sind Spätfolgen solcher Veränderungen und deren Einfluss unter der Bedingung einer Infektion des Gehirngewebes kaum abzuschätzen. Die nun gewählte Methode der Aerosol-Infektion bietet die Möglichkeit, die Infektion des Zentralnervensystems Neugeborener ohne jegliche mechanische Schädigung, die zu Gewebereaktionen und entzündlichen Veränderungen einschließlich Zellinfiltration führen kann, untersuchen zu können.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Infektion der mit der neuen Methode der aerogenen Infektion neugeboren infizierten Ratten näher zu charakterisieren und mit den bekannten Modellen und der natürlichen Infektion zu vergleichen. Dafür wurden an Paraffinschnitten von Gehirnen NBAE-infizierter Ratten, Sentinels, Mütter und Kontrolltiere Standard- und immunhistochemische Färbungen mit verschiedenen Markern durchgeführt, um insbesondere die Virusausbreitung und -verteilung, das Vorhandensein und Ausmaß einer Immunantwort sowie zelluläre Reaktionen von Astrozyten und Neuronen zu untersuchen.

## **5.1 Virusausbreitung**

Von den 30 NBAE-infizierten Ratten wiesen 24 das Virusprotein p38 in allen untersuchten Gehirnarealen auf, wobei bei drei Tieren die äußeren Schichten des Bulbus olfactorius keine positiven Zellen enthielten. Die BDV-positiven Tiere waren zwischen 28 und 310 Tage alt, vier Tiere älter als ein Jahr. Die gleichmäßig diffuse Verteilung des Virus im Gehirn ist typisch für neugeboren infizierte Ratten. Weissenböck *et al.* (2000) beschreiben bei intrazerebral infizierten Tieren eine Zunahme der Proteinverteilung zwischen der vierten und sechsten Woche, jedoch konnte in eigenen Untersuchungen kein signifikanter Unterschied in der Prozentzahl der BDV-positiven Zellen zwischen den vier Wochen alten und den über 15 Wochen alten Tieren festgestellt werden. Das könnte für eine frühe Ausbreitung des Virus im

Gehirn bei den aerogen infizierten Tieren sprechen, da bereits bei 4 Wochen alten Ratten das Virus im gesamten Gehirn vorhanden ist.

Das sieben Tage alte Tier 12 NBAE.1 zeigte sich in der p38-Immunhistochemie frei von angefärbten Zellen. Da es außer einer leichten, in diesem Zusammenhang eher zu vernachlässigenden Erhöhung ED1-positiver Zellen im Kleinhirn in den Untersuchungen keine Auffälligkeiten aufwies, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob bei diesem Tier die experimentelle Infektion nicht angegangen und das Tier gesund war oder es zum Tötungszeitpunkt noch zu keiner Virusproteinsynthese in infizierten Zellen gekommen war. Da bei den bisherigen Infektionsmethoden Purkinjezellen ab Tag sieben infiziert werden (Bautista *et al.*, 1995), ist dieser Befund schwer einzuschätzen und es lassen sich bei diesem Einzelfall keine Rückschlüsse auf die Kinetik der Virusausbreitung ziehen.

Bei dem elf Tage alten Tier 11 NBAE.1 ließ sich Virusprotein nur in wenigen Neuronen in Mittel- und Stammhirn nachweisen. Das ist ungewöhnlich, da sich nach intrazerebraler Infektion in der Regel als erstes die Purkinjezellen im Kleinhirn, dann der Cortex und der Hippocampus infiziert zeigen (Bautista *et al.*, 1995). Naheliegender wäre in der Anfangsphase der Infektion bei der intranasalen Infektionsroute auch das Vorhandensein von Virusprotein im Bulbus olfactorius wie es bei der natürlichen Infektion des Pferdes vorkommt. Leider konnte bei Tier 11 NBAE.1 der Hippocampus nicht ausgewertet werden, es bleibt also offen, ob dieser infizierte Zellen enthält oder nicht. Da BDV direkten Zell-Zell-Kontakt zur Ausbreitung benötigt und die Verbreitung von BDV durch olfaktorische Neuronen zum limbischen System in Ratten gezeigt werden konnte (Carbone *et al.*, 1987; Morales *et al.*, 1988), liegt es nahe, dass bei diesem 11 Tage alten Tier das Virus über olfaktorische Neuronen zum Hippocampus gelangte und sich von dort weiter zum Mittel- und Stammhirn ausbreitete. Warum im Bulbus olfactorius keine positiven Zellen detektiert wurden und warum sich das Virus nicht wie erwartet vom limbischen System in den normalerweise am Anfang der Infektion betroffenen Cortex weiterverbreitet hat, kann hier nicht beantwortet werden. Mögliche Erklärungen sind, dass Zellen in diesen Regionen in einer noch früheren Phase infiziert waren und das Protein dann eliminiert werden konnte oder dass Zellen zwar infiziert sind, aber kein p38-Protein synthetisiert wurde. Eine alternative Erklärung wäre, dass nach Aufnahme das Virus über entsprechende Projektionsbahnen ohne Vermehrung im Bulbus olfactorius und Frontalhirn in kaudale Hirnregionen gelangt. Morales *et al.* (1988) zeigten, dass nach intranasaler Infektion adulter Ratten das Virus intraaxonal von den Neurorezeptoren im olfaktorischen Epithel ins Gehirn wandert.

Um dieser Frage nachzugehen, müssten weitere Untersuchungen an Tieren jüngerem Alters durchgeführt werden und außer Protein auch ein RNA-Nachweis (zum Beispiel mittels In-Situ-Hybridisierung) erfolgen.

Der Nachweis von p38-Protein im Mittel- und Stammhirn bei einem nur elf Tage alten Tier und die Verteilung des BDV in den vier Wochen alten Ratten sprechen für eine besonders rasche Ausbreitung des Virus im Gehirn der über die aerogen/intranasalen-Methode infizierten Tiere, jedoch müssten, um den genauen Verlauf der Virusausbreitung zu Beginn der Infektion bei diesen Tieren genauer zu verifizieren, weitere Untersuchungen in kürzeren Abständen nach Infektion erfolgen.

Nach Weissenböck *et al.* (2000) nimmt bei intrazerebral infizierten Ratten die Verbreitung der Proteine im Gehirn zwischen der 28. und 52. Woche allmählich ab, während Narayan *et al.* (1983a) eine zeitlich unbegrenzte Virusreplikation in adult und neugeborenen intrazerebral infizierten Ratten beschreibt. In den eigenen Untersuchungen konnte kein Rückgang der Virusproteinmenge und -verbreitung festgestellt werden. Auch das 64 Wochen alte, das 91 Wochen alte, das 98 Wochen alte und das über zwei Jahre alte Tier zeigten immer noch zahlreiche positive Zellen im gesamten Gehirn. Weder bezüglich des Anteils infizierter Zellen, noch der Verteilung des BDV im Gehirn konnten deutliche Unterschiede zwischen Tieren der verschiedenen Altersstufen festgestellt werden, was für eine lebenslange Persistenz ohne Rückgang infizierter Zellen spricht.

Besonders viele infizierte Zellen fanden sich im Cortex und in der Pyramiden-Zellschicht des Hippocampus. Das entspricht den Erwartungen für die neugeborenen infizierte Ratte. Auch gehören diese Areale zu den Schwerpunkten der Infektion beim Pferd (Bilzer *et al.*, 1996, Lebelt und Hagenau, 1996). Dagegen überraschten die großen Unterschiede (4-60%) in der Purkinje-Zellschicht im Kleinhirn. Neurone gelten als die Hauptzielzellen des BDV und bei neugeborenen infizierten Ratten werden die Purkinjezellen bereits ab Tag sieben infiziert und gehen zwischen Tag 27 und 75 p.i. verloren (Bautista *et al.*, 1995; Eisenman *et al.*, 1999; Zocher *et al.*, 2000).

Es sollte hier kritisch bemerkt werden, dass bei den Tieren mit verminderter Purkinjezellzahl nur wenige Zellen ausgezählt werden konnten, da im gesamten Schnitt teilweise nicht mehr als 40 Purkinjezellen zu finden waren und die Prozentangabe kein verlässlich repräsentatives Ergebnis darstellt.

Im Bulbus olfactorius waren verglichen mit anderen Arealen wenige Zellen infiziert.



Außer den beiden wenige Tage alten Ratten gab es noch drei weitere aerosol-infizierte Tiere, die in der Immunhistochemie negativ blieben und ein Tier (VII NBAE.2), das nur im Bulbus olfactorius und im Cortex vereinzelt Zellen mit BDV-Protein aufwies.

Diese vier Tiere waren in einer Geschwistergruppe mit gleicher Dosis und Tötung im gleichen Alter, die die oben beschriebene weite Verbreitung im gesamten Gehirn aufwiesen.

Die vier Tiere zeigten neben einer leichten Erhöhung GFAP- und Vimentin-positiver Zellen keine anderen Auffälligkeiten. Es ist denkbar, dass diese Tiere entweder nicht erfolgreich infiziert waren, dass also kein oder nicht genügend infektiöses Virus in das Nervensystem gelangen konnte, dass das Virus in infizierten Zellen nur einen unvollständigen

Vermehrungszyklus durchlief oder dass das Virus nach Ausbreitung im ZNS von den Tieren eliminiert werden konnte. Letzteres ist nicht auszuschließen, aber unwahrscheinlich, da das Virus, selbst wenn die Infektion bei älteren Tieren erfolgt, bei denen eine Immunreaktion stattfindet, im Gehirn persistiert. Auch in Fällen, in denen antivirale Antikörper in neugeborenen infizierten Ratten gefunden werden, zeigen diese keine neutralisierende Aktivität (Stitz *et al.*, 1998). Gegen eine Eliminierung des Virus spricht auch, dass bei keinem dieser Tiere Infiltrate oder eine Mikrogliose festgestellt werden konnte. Das ist besonders bei dem vier Wochen alten Tier 19 NBAE.4 von Aussagekraft, da alle vier gleich behandelten und gleich alten Wurfgeschwister Infiltrate im Gehirn aufwiesen.

Interessanterweise zeigten auch die zwei Sentinels der Gruppe VII keine Immunreaktion, aber eine leichte Erhöhung GFAP- und Vimentin-positiver Zellen.

Bei einem Versuch, bei dem BDV-spezifische CD4<sup>+</sup>-Zellen (Zelllinie ohne zytolytische Aktivität) vor der BDV-Inokulation transferiert wurden, konnte die Infektion verhindert werden. Diese Tiere zeigten nur eine geringgradige vorübergehende Enzephalitis, kurzfristige Virusreplikation im Gehirn und konnten danach über die frühzeitige CD8<sup>+</sup>-T-Zellaktivität, die durch die transferierten CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen begünstigt wurde, das Virus komplett eliminieren (Nöske *et al.*, 1998). Möglicherweise konnten die negativen Tiere und die Sentinels vor einer später erfolgten Infektion durch Exposition von BDV-Antigenen solche Lymphozyten bilden und waren dann später in der Lage, die Ausbreitung von BDV im Gehirn zu verhindern.

Dass bei dem negativen Tier der Gruppe 19 keinerlei Reaktion zu beobachten war, kann an dem jungen Alter von 4 Wochen des Tieres liegen. Bei Versuchen von Sauder und Staeheli (2003) wurden die Mütter nie krank, die vor Tag 40 von dem infizierten Nachwuchs getrennt

wurden. Möglicherweise erfolgt in diesem Zeitraum noch keine Virusausscheidung der Geschwister und damit keine Ansteckung.

Das Tier VII NBAE.2, bei dem vereinzelt p38-positive Zellen im Bulbus olfactorius und Cortex detektiert wurden, könnte eine solche leichte beginnende Infektion repräsentieren, auch wenn dieses Tier mit 110 Tagen genauso alt, bzw. älter ist als die negativen NBAE-Tiere. Bei Morales *et al.* (1988) traten bei den Müttern erste Zeichen einer Krankheit auf, wenn die Jungen 3-5 Monate alt waren. Über den Zeitpunkt der Ansteckung durch die Geschwister und den Verlauf der Infektion bei Sentinels, bzw. nicht erfolgreich infizierten Geschwistern ist dagegen wenig bekannt. So lässt sich die Vermutung nicht ausschließen, dass sich Tiere trotz gleicher Haltungsbedingungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten infizieren. Möglicherweise variiert hier Infektionszeitpunkt und die Ansteckung erfolgt nicht einheitlich in einem bestimmten Alter. Dass das Tier VII NBAE.2 das Virus nach erfolgreicher aerogener Infektion weitgehend eliminieren konnte, ist nicht nur aus oben genannten Gründen unwahrscheinlich, dagegen spricht auch, dass bei diesem Tier im Gegensatz zu der Mehrzahl der NBAE-Tiere weder Axonschwellungen, noch eine verminderte Anzahl der Purkinjezellen als Folge einer frühen Infektion festgestellt wurden. Vielmehr scheint das Tier sich am Beginn einer Infektion befunden zu haben.

Um zu klären, ob es bei der Borna Krankheit möglicherweise eine transiente Infektion gibt, müssten weitere Untersuchungen an Sentinels verschiedenen Alters erfolgen, damit der Zeitpunkt der Ansteckung, eine Immunantwort und eine Elimination des Virus bestimmt werden kann.

Bei den beiden Müttern müsste im Falle einer Ansteckung durch die Jungtiere das Bild dem der adult infizierten immunkompetenten Ratten entsprechen, die wie erkrankte Pferde und Schafe die typische Borna Krankheit entwickeln, mit Enzephalitis gefolgt von langsamen Rückgang der Entzündung und der akuten Symptome mit anschließender Viruspersistenz. Diesem Bild entspricht das Tier 0.Mu, das eine starke Entzündung und Virusprotein in allen Gehirnarealen aufweist. Dagegen stellt das Tier 11.Mu einen anderen Fall dar, da es zwar mononukleäre Infiltrate zeigt, aber frei von p38-Protein ist. Möglicherweise reichte hier die Virusdosis, die von ihren Nachkommen ausgeschieden und von der Mutter aufgenommen wurde, nicht aus, um eine typische Borna Krankheit auszulösen, sondern konnte durch die Immunantwort des Tieres wie auch bei den oben genannten BDV-negativen Tieren eliminiert, beziehungsweise an der Ausbreitung gehindert werden.

Neben den Tieren, bei denen trotz Infektion kein BDV-Protein nachzuweisen war und die zum Zeitpunkt der Tötung keine Immunreaktion zeigten, gab es unter den erfolgreich NBAE-infizierten Ratten sechs Tiere, die CD45-positive mononukleäre Zellinfiltrate aufwiesen. Alle diese Tiere hatten Virusprotein im gesamten Gehirn und es wurde kein deutlicher Unterschied in der Menge positiver Zellen zu den Tieren ohne Entzündung festgestellt. Warum die 110 Tage alten Tiere der Gruppe VII eine Entzündung zeigten und ob diese Immunantwort zu einem späteren Zeitpunkt zu einer Eliminierung des BDV oder Eindämmung der Virusausbreitung führen könnte, wird in „Immunologische Reaktion“ noch einmal aufgegriffen. Obwohl neugeborenen BDV-infizierte Ratten als immuntolerant gelten, ist bekannt, dass bei intrazerebral infizierten Tieren im Alter von vier Wochen eine transiente mononukleäre Inflammation auftritt (Hornig *et al.*, 1999; Sauder und De la Torre, 1999; Weissenböck *et al.*, 2000). Dies war auch bei allen vier Wochen alten Tieren der Gruppe 19 der Fall und es ist nicht zu erwarten, dass das Virus durch diese eliminiert oder vermindert wird, sondern dass die Entzündung (Infiltrate) wieder abklingt und das Virus in großen Mengen im ZNS persistiert.

Wie erwartet waren die mononukleären Zellen um die Gefäße in allen Fällen mit Zellinfiltraten p38-negativ. Das entspricht bisherigen Beobachtungen, bei denen vor allem Neurone, seltener Astrozyten, ependymale Zellen und Oligodendrozyten BDV-infiziert sind, aber nicht die Entzündungszellen (Herden *et al.*, 2005).

Eine Dosisabhängigkeit bezüglich der Virusproteinmenge und dem Grad der Ausbreitung bei den NBAE-infizierten Ratten konnte nicht festgestellt werden. Jedoch war eines der Tiere, die mit der geringsten Dosis von 200 µl behandelt wurden, negativ und zwei zeigten eine Entzündung, was vermuten lässt, dass die Infektion am ersten Lebenstag nicht erfolgreich war. Eines der Tiere der 400 µl-Gruppe und eines der 1000 µl-Gruppe blieben ebenfalls negativ. Alle Ratten, die mit der Dosis von 500 µl behandelt wurden, waren BDV-positiv. Es ist daher naheliegend anzunehmen, dass eine niedrige Dosis die Erfolgschancen für das Angehen einer Infektion an Tag 1 vermindert, eine hohe Dosis aber keine erfolgreiche Infektion garantiert.

Zusammenfassend lässt sich für die mit der neuen Methode infizierten Tiere sagen, dass, wenn diese erfolgreich infiziert werden konnten, das BDV sich rasch und weit im Gehirn verbreitet und die Verbreitung von Virusprotein auch im hohen Alter von über zwei Jahren nicht abnimmt. Auch bestätigt werden konnte die Beobachtung, dass persistent infizierte Tiere in der Lage sind, bei Kohabitation naive adulte Ratten anzustecken (Morales *et al.*, 1988; Sauder

und Staeheli, 2003) wie bei dem Muttertier 0.Mu gezeigt wurde. Es wird angenommen, dass persistent infizierte Tiere Virus über Körpersekrete ausscheiden, da infektiöses Virus in Urin und Speichel infizierter Ratten nachgewiesen werden konnte (Morales *et al.*, 1988; Nitzschke, 1963).

Allerdings waren immerhin vier von 28 NBAE-Tieren BDV-negativ, also nicht erfolgreich infiziert und zwei Tiere zeigten eine starke Immunantwort, die vermuten lässt, dass diese Tiere bei der experimentellen Infektion nicht genügend Virus erhalten haben und sich zu einem späteren Zeitpunkt, in einem Alter, in dem das Immunsystem ausgereift war, an dem von den infizierten Wurfgeschwistern ausgeschiedenen Virus infiziert haben.

## 5.2 Immunologische Reaktion

Bei der natürlichen Infektion von Pferden und Schafen und der experimentellen Infektion der adulten immunkompetenten Ratte und der meisten Mäusestämme ist die Borna Krankheit charakterisiert durch eine schwere Enzephalitis. Die Pathogenese dieser ist am besten dokumentiert bei dem Rattenmodell, bei dem sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in den Zellinfiltraten präsent sind und die Elimination oder funktionale Blockade dieser Lymphozyten sowohl BDV-induzierte Symptome als auch histopathologische Veränderungen im Gehirn verhindert (Bilzer und Stitz, 1996). Das Auftreten von klinischen Anzeichen deckt sich zeitlich mit dem Auftreten einer entzündlichen Reaktion (Carbone *et al.*, 1987) und T-Zellen, die aus dem Gehirn gewonnen werden, weisen hohe lytische Aktivität gegen Zielzellen auf (Batra *et al.*, 2003; Planz *et al.*, 1993; Sobbe *et al.*, 1997) und sind für zelluläre Degeneration und kortikale Atrophie verantwortlich (Bilzer und Stitz, 1994; Sobbe *et al.*, 1997).

Dagegen sind Symptome und neurodegenerative Erscheinungen bei neugeborenen infizierten Ratten wahrscheinlich nicht auf eine Immunreaktion zurückzuführen. Zwar kommt es zumindest bei intrazerebral infizierten Tieren zu reproduzierbaren transienten mononukleären Infiltraten (Weissenböck *et al.*, 2000), die mehrheitlich T-Zellen, weniger NK-Zellen, Monozyten/Makrophagen und B-Zellen enthalten (Hornig *et al.*, 1999; Weissenböck *et al.*, 2000), jedoch handelt es sich nicht um BDV-spezifische Lymphozyten. Das Vorkommen solcher Infiltrate fällt mit dem Höchststand der neuronalen Apoptose zusammen. Jedoch ist es unwahrscheinlich, dass infiltrierende Zellen eine wesentliche Rolle in der Neuropathogenese

bei neugeborenen infizierten Tieren spielen (Weissenböck *et al.*, 2000), da die Verteilung dieser und der apoptotischen Zellen nicht übereinstimmt und neonatal thymektomierte und infizierte Ratten ein ähnliches Muster von Apoptose ohne Inflammation zeigen (Hornig und Stitz, unveröffentlicht; Weissenböck *et al.*, 2000).

Diese Beobachtungen konnten in den eigenen Untersuchungen weitgehend bestätigt werden. Kontrolltiere, BDV-negative Tiere (außer einem Muttertier) und 20 erfolgreich NBAE-infizierte Ratten waren frei von Infiltraten und zeigten in der CD45-Immunhistochemie keine angefärbten Zellen im Neuropil. Lediglich die vier BDV-positiven vier Wochen alten Tiere zeigten zahlreiche kleine gefäßassoziierte Infiltrate. Diese ovalen rundkernigen Zellen waren insgesamt zu etwa einem Drittel CD45-positiv, wobei der Anteil an CD45-positiven Zellen in den einzelnen Infiltraten von 0 bis über 80% stark schwankte. Außerdem wiesen zwei dieser Tiere zusätzlich CD45-positive Zellen diffus im Hirnparenchym auf. Keine der Zellen expri-mierte CD8. Das überrascht nicht, da in adult infizierten Tieren MHC-I-abhängige CD8<sup>+</sup>-T-Zellen Effektorzellen repräsentieren, die die Krankheit verursachen (Bilzer und Stitz, 1994; Sobbe *et al.*, 1997), in neugeborenen intrazerebral infizierten aber die vorübergehende Immunantwort als unspezifisch und nicht destruktiv gilt (Weissenböck *et al.*, 2000). Auch eine mittelgradige Mikrogliose wurde in eigenen Untersuchungen mit dem Antikörper gegen ED1 bei den vier Wochen alten Tieren detektiert. Vor allem bei Tier 19 NBAE.5 war die Verteilung der angefärbten Zellen vielfach fokal und gefäßassoziiert, woraus sich schließen lässt, dass es sich bei den infiltrierenden Zellen auch um Makrophagen handelt oder gewebsständige Mikroglia-Zellen durch die eingewanderten Immunzellen rekrutiert wurden. Eine mittelgradige bis starke Erhöhung ED1-exprimierender Zellen kam auch im Gehirn aller anderen erfolgreich NBAE-infizierten Tieren vor. Diese unspezifische Immunreaktion war nicht unbedingt bei den nicht invasiv infizierten Tieren dieser Studie zu erwarten, auch wenn Weissenböck *et al.* (2000) bei intrazerebral infizierten Ratten eine deutliche Mikrogliose nach vier Wochen beschreiben, die mindestens bis zur 52. Woche besteht. In eigenen Untersuchungen war selbst bei den über einem Jahr alten Tieren eine Mikrogliose festzustellen und das 11 Tage alte Tier zeigte bereits eine leichte Reaktion ventral des Hippocampus und im Kleinhirnmark.

Alle Tiere der Gruppe 0, die mit einer Virusdosis von 500 µl infiziert wurden, zeigten das typische Bild einer BDV-Infektion immuninkompetenter Ratten. Bei diesen Tieren konnte man Virusprotein im gesamten Gehirn finden und den direkten Effekt des Virus in Form einer

deutlichen Gliareaktion in Abwesenheit einer spezifischen Immunreaktion, beziehungsweise in Anwesenheit von Immuntoleranz sehen.

Bei dem Tier VII NBAE.2, bei dem sich nur vereinzelt in Bulbus olfactorius und Cortex BDV-positive Zellen fanden, war keine Erhöhung von Mikrogliazellen/Makrophagen zu erkennen.

Mikroglia-Aktivierung im Gehirn ist zwar schon ab 24 Stunden nach einem Insult detektierbar, Proliferation der Mikrogliazellen findet aber erst nach zwei bis drei Tagen statt (*Übersicht in Streit et al., 1999*). Tier VII NBAE.2 wurde also möglicherweise zu Beginn der Infektion noch vor einer mikroglialen Proliferation getötet oder die wenigen infizierten Zellen reichten nicht, um diese unspezifische Immunantwort auszulösen.

Es ist bekannt, dass mikrogliale Zellen unterschiedliche morphologische Erscheinungsformen annehmen können und dass diese mit funktionellen Stadien korrelieren (*Übersicht in Streit et al., 1988*). Die ruhende Mikroglia ist relativ klein und hat dünne verzweigte Fortsätze. Bei Aktivierung nach verschiedenen Gehirninsulten entwickelt die Zelle vergrößerte Zellfortsätze und ein buschiges Aussehen. Bei Zelltod von Neuronen transformieren Mikrogliazellen zu phagozytierenden Makrophagen mit deren typischer Morphologie (große zytoplasmareiche Zellen ohne deutliche Ausläufer) (*Übersicht in Streit et al., 1999*). Wilson und Molliver (1994) beschreiben noch ein hypervverzweigtes intermediäres Stadium, das durch mehr schleichende degenerative Veränderungen hervorgerufen werden kann.

In den für diese Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen zeigten angefärbte Zellen in infizierten Tieren fast ausschließlich eine Morphologie, die dem beschriebenen aktivierten Stadium der Mikroglia entspricht.

Es wird angenommen, dass es Interaktionen gibt, bei denen pathologisch veränderte Neurone über direkten Zell-Zell-Kontakt Signale an Mikrogliazellen geben und diese damit aktivieren (*Übersicht in Streit et al., 1999*). BDV gilt als nicht-zytopathogenes Virus. Trotzdem scheint es so starke Veränderungen in Neuronen, die Hauptzielzellen von BDV sind, hervorzurufen, dass auch ohne direkte Zytolyse durch das Virus die Infektion eines Neurons zu Veränderungen der Zelle führen kann, durch die Signale gegeben werden, die Mikroglia aktivieren. Hierbei spielen verschiedene Mediatoren wie Interferone, Interleukine und TNF eine Rolle, die die Mikroglia aktivieren. Eine besondere Bedeutung kommt bei viralen Infektionen dem IF N  $\alpha/\beta$  zu, das in verschiedenen Zelllinien eine BDV-Infektion verhindern kann (Hallensleben und Staeheli, 1999; von Rheinbaben *et al.*, 1985). Hallensleben *et al.* (2005)

konnte bei Mäusen zeigen, dass IFN- $\gamma$  eine zentrale Rolle bei der Resistenz gegen eine BDV-Infektion des ZNS und der Eliminierung von BDV in Neuronen spielt.

Wenn auch nicht genau bekannt ist, wie das Virus die Neuronen schädigt und welche Mechanismen letztendlich zur Verminderung der Neuronenzahl führen, ist diese mikrogliale Aktivierung ein Indiz dafür, dass in den infizierten Neuronen anormale Bedingungen herrschen. Dazu passt auch, dass außer dem sieben Tage alten Tier, das eine nur leichte Erhöhung ED1-exprimierender Zellen in Stamm- und Kleinhirn hatte, keines der negativen Tiere eine Mikrogliose zeigte. Das spricht für die Annahme, dass es bei diesen Tieren trotz Exposition zu keiner Infektion kam oder das Virus in einer transienten Immunreaktion eliminiert werden konnte.

Einen besonderen Fall stellen die zwei Tiere der Gruppe VII dar, die wie die anderen Ratten der Gruppe am ersten Lebenstag infiziert wurden. Beide Tiere zeigten in der p38-Immunhistochemie angefärbte Zellen in allen Hirnarealen, jedoch wiesen die Tiere auch rundkernige zu unterschiedlichen Anteilen CD45-positive Infiltrate in allen Regionen außer im Klein-, beziehungsweise in einem Fall im Stammhirn auf und diffus CD45-positive Zellen im Parenchym. Hier kamen in den Infiltraten auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und eine starke, teilweise gefäßassoziierte Mikrogliose vor. Damit entsprachen diese Tiere wie auch das Muttertier 0.Mu dem typischen Bild einer immunkompetenten adult infizierten Ratte, obwohl sie wie die gleichaltrigen Geschwister am ersten Lebenstag dem Aerosol ausgesetzt worden waren. Bei intrazerebral adult infizierten Tieren sind sowohl T-Zell-Infiltrate als auch Zellen mit mikroglialer Morphologie ab dem 24. Tag zu beobachten (Deschl *et al.*, 1990; Herden *et al.*, 2005). Dass die experimentelle Infektion bei den beiden erwähnten Tieren direkt angegangen war, ist nicht anzunehmen, da das Immunsystem bei neugeborenen Tieren noch nicht ausgereift ist und aufgrund der Immuninkompetenz, beziehungsweise der induzierten Immuntoleranz keine spezifische Immunantwort in Form von T-Zell-Infiltraten vorkommt. Es ist also anzunehmen, dass bei den beiden Tieren die Infektion am ersten Lebenstag nicht erfolgreich war und sich die Tiere dann später, wie auch die Mutter, bei den erfolgreich infizierten Geschwistertieren ansteckten. Das positive Muttertier beweist, dass eine Ansteckung durch die experimentell infizierten Ratten prinzipiell möglich ist. Es ist zu bemerken, dass die Tiere zu der Gruppe mit der niedrigsten Virusdosis gehörten, also möglicherweise die Wahrscheinlichkeit auf Misslingen der experimentellen Infektion hier höher ist. Nicht auszuschließen ist auch eine verlängerte Latenzzeit. In diesem Falle wäre das Virus zwar in das Gehirn dieser Tiere bei der experimentellen Infektion gelangt, eine Vermehrung und/oder eine Ausbreitung und das

Auslösen einer Immunantwort wäre aber erst später nach Ausreifung des Immunsystems erfolgt. Von solchen Fällen wurde bisher nicht berichtet und eine Bestätigung ist schwer zu erbringen, da ein Nachweis des Virus im Gehirn am lebenden Tier nicht möglich ist und so der Verlauf der Virusausbreitung bei solchen Tieren nicht verfolgt werden kann.

Das zweite Muttertier der Gruppe 11 wies zwar CD45- und CD8-positive Infiltrate und eine Mikrogliose auf, jedoch war es frei von p38-Protein. Aufgrund der starken Immunreaktion kann man von einer Infektion ausgehen. Allerdings ist bisher kein Fall bekannt, bei dem ohne Gabe von BDV-spezifischen CD4<sup>+</sup>-Zellen vor der Infektion (Nöske *et al.*, 1998) das Virus durch diese eliminiert werden konnte oder zumindest keine virale Expression von p38 stattfand.

### 5.3 Gewebsreaktion

Neben einer spezifischen oder unspezifischen Immunantwort, kann der Organismus auch mit Veränderungen von Gewebezellen des Gehirns auf Insulte reagieren. Verschiedene Störungen können in den unterschiedlichen Zelltypen des Gehirns morphologische und /oder zytochemische Reaktionen auslösen, die auch ohne Zelluntergang oder Symptome ein Indiz für pathologische Vorgänge sind. Es ist bekannt, dass bei neugeborenen intrazerebral BDV-infizierten Ratten spezifische neuronale Populationen geschädigt werden und wahrscheinlich für die beobachteten Symptome verantwortlich sind (Bautista *et al.*, 1994; Hornig *et al.*, 2001; Pletnikov *et al.*, 2002a). Apoptose von Neuronen wird bei intrazerebral infizierten Tieren ab der vierten Woche beschrieben (Hornig *et al.*, 1999; Weissenböck *et al.*, 2000; Zocher *et al.*, 2000) und resultiert unter anderem in Kleinhirnhypoplasie, fortschreitender Degeneration des Gyrus dentatus und kortikaler Schrumpfung (Bautista *et al.*, 1995; Gonzalez-Dunia *et al.*, 2000; Hornig *et al.*, 1999). Die genauen Vorgänge und die Ursache für den Neuronenverlust sind dagegen nicht aufgeklärt.

In eigenen Experimenten wurden Marker für die Intermediärfilamente Vimentin und GFAP für die Einschätzung astroglärer Reaktion und die Nissl-Färbung und der immunhistochemische Nachweis von Neurofilament für Veränderungen der Neurone gewählt.



## Astrozyten

Reaktive Gliose, die Schwellung und Hypertrophie der glialen Zellkerne, Zellkörper und Fortsätze einschließt (Dyer *et al.*, 2000; Fattore *et al.*, 2002; Petzold *et al.*, 2002; Pindon *et al.*, 2000; Rugg-Gunn *et al.*, 2002; Vitaliani *et al.*, 2002), ist ein grundlegender pathologischer Effekt bei vielen Insulten und Verletzungen des ZNS.

Astrozyten haben im gesunden Gehirn viele vitale Funktionen: Sie regulieren die Formation der Blut-Hirn-Schranke, die Homöostase im Gehirn, neuronale Aktivität, synaptische Transmission, neuronales Überleben, Synaptogenese und Neurogenese (Dani *et al.*, 1992; Golman, 2003; Kesslak *et al.*, 1986; Lim und Alvarez-Buylla, 1999; Newman, 2003; Ramson, 2003; Slezak und Pfrieder, 2003; Vesce *et al.*, 1999).

Im geschädigten Gehirn regulieren Astrozyten die neuronale Schädigung, sowohl direkt über die Produktion von Wachstumsfaktoren (Dhandapani *et al.*, 2003), Rezeptoren (Daniels und Brown, 2001) und Transportern (Canolle *et al.*, 2004) als auch indirekt über eine Modulation der Entzündungsreaktion mittels Verminderung der Expression von mikroglialen Mediatoren (Aloisi *et al.*, 1997; Pyo *et al.*, 2003; Vincent *et al.*, 1996 und 1997).

Die Beeinflussung von Neuronen ist bidirektional. Neurotransmitter, die von Neuronen freigesetzt werden, binden an gliale Rezeptoren und Astrozyten sezernieren viele Faktoren, die die neuronale Synapsenformation beeinflussen (Slezak und Pfrieder, 2003).

Da bei der BDV-Infektion der neugeborenen Ratte sowohl Astrozyten als auch Neuronen infiziert werden und die genauen Wechselwirkungen der beiden Zelltypen nicht bekannt sind, kann nicht gesagt werden, ob infizierte Astrozyten für die neuronalen Veränderungen verantwortlich sind oder durch das Virus direkt Störungen in den Neuronen hervorgerufen werden, die wiederum Reaktionen in Astrozyten auslösen oder sogar beides wechselseitig der Fall ist und noch andere Zelltypen eine Rolle spielen. Streit *et al.* (1999) beschreiben zum Beispiel die Wechselwirkung von Mikroglia und Neuronen und die Autoren nehmen an, dass durch direkten Zell-Zell-Kontakt Signale über den Zustand der Nervenzelle von dem Neuron an die Mikrogliazelle gegeben werden und danach entweder trophische oder toxische Faktoren von dieser an das Neuron übermittelt werden. Auch ist bekannt, dass zumindest in Zellkulturen Astrozyten auf Mikrogliazellen einwirken können und morphologische und funktionelle Veränderungen auslösen (Kloss *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1994; Tanaka und Maeda, 1996).

Da Astrozyten bei vielen verschiedenen Insulten und Verletzungen des Gehirns reagieren, ist davon auszugehen, dass bei der intrazerebralen Infektion der Ratte allein die mechanische Verletzung von Hirngewebe durch die Injektionsnadel und das Injektionsvolumen eine astro-

gliäre Reaktion auslöst, gegen die primäre Folgen der BDV-Infektion nicht eindeutig abgegrenzt werden können. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Aerosol-Methode dagegen kann jede Gewebsreaktion als Folge der Virusinfektion gewertet werden.

In den eigenen Untersuchungen zeigten außer den Kontrolltieren nahezu alle Tiere eine astrogliäre Reaktion im Sinne einer Erhöhung GFAP-exprimierender Zellen. Auch die Zahl Vimentin-positiver Zellen war parallel dazu in den meisten Fällen erhöht. Nur in vier Fällen waren diese nicht deutlich vermehrt, während die GFAP-Immunhistochemie eine mittelgradige Erhöhung angefärbter Zellen zeigte. Bei zwei Tieren mit Entzündung war der umgekehrte Fall mit mittelgradiger Erhöhung Vimentin-exprimierender Zellen ohne erhöhte GFAP-Expression zu beobachten.

Dieser Zusammenhang überrascht nicht und es ist davon auszugehen, dass es die gleichen Zellen sind, nämlich reaktive Astrozyten, die die beiden Intermediärfilamente exprimieren. Während GFAP als spezifischer Marker für reife Astrozyten gilt, kommt Vimentin in einer Vielzahl von Zellen mesenchymalen Ursprungs wie Fibroblasten und endothelialen Zellen vor (Franke und Moll, 1987). In Astrozyten wird es in frühen Stadien der Gehirnentwicklung exprimiert (Bignami *et al.*, 1982). Um den Geburtszeitpunkt, bei Nagern postnatal (Pixley und de Vellis, 1984; Tapscott *et al.*, 1981), erfolgt eine Auswechslung der Expression von Vimentin zu GFAP. Vimentin wird dann nicht mehr exprimiert und in ausdifferenzierten Astrozyten, die übergangsweise beide Neurofilamente koexprimieren, fortschreitend von GFAP ersetzt (Galou *et al.*, 1996). Die transiente Koexpression beider Filamente in Astrozyten, wie sie in eigenen Untersuchungen festgestellt wurde, wurde immunhistochemisch auch in den meisten Modellen für Gliose beobachtet (Norenberg, 1994; Schiffer *et al.*, 1986; Stringer, 1996). Zusätzlich haben Studien mit Doppelfärbungen gezeigt, dass Vimentin in reaktiven Astrozyten, die ebenfalls GFAP-positiv waren, exprimiert wurde (Janeczko, 1993). Außer in ependymalen Zellen, die sich auch in eigenen Untersuchungen erwartungsgemäß positiv zeigten, aber in der Auswertung vernachlässigt wurden, da sie im gesunden wie im kranken Gehirn gleichermaßen vorkommen, ist die Vimentin-Expression im adulten Nagergehirn auf radiäre Glia wie die Bergmann Glia im Kleinhirn und Schwann Zellen beschränkt, was zur Annahme führte, dass Vimentin ein spezifischerer Marker für Gliose ist als GFAP (Lenz, 1997; Norenberg, 1994).

Es ist also davon auszugehen, dass die gleichzeitige Erhöhung der Vimentin- und GFAP-Expression bei betroffenen Tieren in den eigenen Untersuchungen für eine reaktive Gliose

steht und nicht nur mit strukturellen Veränderungen, sondern auch mit einer Proliferation der Astrozyten einhergeht.

Bei den erfolgreich NBAE-infizierten Ratten zeigte nur das 11 Tage alte Tier 11.NBAE.1 weder eine deutliche Erhöhung der GFAP- noch der Vimentin-Expression. Bautista *et al.* (1995) und Carbone *et al.* (1991) beschreiben bei intrazerebral infizierten Ratten eine diffuse reaktive Astrozytose schon ab dem dritten Tag p.i., also schon bevor BDV-Protein in Zellen nachgewiesen werden kann. Diese Beobachtungen können hier für neugeborenen aerosol-infizierte Tiere ohne mechanische Schädigung des Hirngewebes nicht bestätigt werden. Allerdings wurden in den eigenen Untersuchungen GFAP-exprimierende Zellen gezählt, nicht aber die Stärke der Expression von GFAP an sich gemessen. Daher kann eine Reaktion im Sinne erhöhter GFAP-Expression einzelner Zellen ohne Proliferation nicht ausgeschlossen werden, ist aber unwahrscheinlich, da eine Reaktion der Astrozyten mit der Expression von Vimentin einhergeht und auch diese in diesen beiden Tieren nicht erhöht war.

Die 11 Tage alte infizierte Ratte hatte einige BDV-positive Zellen und wie das 7 Tage alte Tier 12 NBAE.1, das zwar infiziert wurde, aber negativ in der p38-Immunhistochemie war, eine leichte Mikrogliose, war aber sonst frei von Auffälligkeiten. In diesen beiden Fällen zeigte sich also eine mikrogläre Proliferation vor der Astrozytose. Diese Beobachtung spricht dagegen, dass reaktive Astrozyten für die Veränderungen der Mikrogliazellen verantwortlich sind. Da Neuronen die ersten Zellen sind, die bei der BDV-Infektion der Ratte infiziert werden, ist es vielmehr naheliegend, dass diese durch das Virus schon in der frühen Phase der Infektion Veränderungen erfahren, die Mikro- und Astrogliazellen aktivieren. Um diese Vermutungen zu bestätigen, müssten weitere Untersuchungen an Tieren in den ersten Tagen der Infektion erfolgen und Wechselwirkungen zwischen den Zelltypen beispielsweise durch die Bestimmung von Cytokinexpression und Doppelfärbungen charakterisiert werden.

Bei allen anderen erfolgreich NBAE-infizierten Tieren war eine deutliche Vermehrung GFAP-exprimierender Zellen zu detektieren. Vimentin-exprimierende Zellen dagegen waren in zwei Fällen nicht deutlich erhöht, bei dem Tier VII NBAE.2, das nur wenige BDV-positive Zellen und keine Mikrogliose aufwies, sowie dem 450 Tage alten Tier VIII NBAE.3. Da die Expression von Vimentin als spezifischerer Marker für reaktive Astrogliose gilt, spricht dies möglicherweise für weniger starke Aktivierung der Astrozyten bei dem Tier mit nur wenig infizierten Zellen, bzw. eine bereits nachlassende Reaktion bei der relativ alten Ratte. Allerdings zeigten die anderen drei über ein Jahr alten Tiere eine deutliche Erhöhung Vimentin-positiver Zellen. Insgesamt sprechen die Ergebnisse der 310 Tage alten und älteren

Tiere für die Annahme, dass mit der persistierenden Infektion auch die Mikrogliose und Astrogliose lebenslang bestehen bleibt.

Bei den anderen 17 Ratten, die erfolgreich NBAE-infiziert wurden, lassen sich keine signifikanten Unterschiede in der Erhöhung der Astroglia-Reaktion bezüglich Alter oder Dosis feststellen. Bemerkenswert ist, dass auch die 310 Tage alten Tiere keine nachlassende Reaktion zeigen.

Auffällig ist außerdem, dass obwohl in zahlreichen Fällen die Menge GFAP-positiver Zellen in allen untersuchten Hirnarealen erhöht war, in keinem Fall eine Vermehrung Vimentin-positiver Zellen im Mittel- und Stammhirnbereich vorlag.

Es ist bekannt, dass im ZNS eine Reihe von Astrozyten mit unterschiedlicher Morphologie vorkommen. Inwieweit diese Unterschiede unterschiedliche Astrozytentypen oder verschiedene Umgebungsstimuli repräsentieren, ist noch unklar (*Übersicht in Ridet et al., 1997*). Die Astrozytennarbe ist morphologisch und biochemisch unterschiedlich in verschiedenen Hirnarealen, was ebenfalls auf das Vorhandensein unterschiedlicher Astrozytentypen hindeutet (Alonso und Privat, 1993). Welche Typen von Astrozyten wann welche Filamente exprimieren, ist nicht eindeutig geklärt. Es wäre also denkbar, dass im Mittel- und Stammhirnbereich im Gegensatz zu den anderen für diese Arbeit untersuchten Regionen Astrozyten vorherrschen, die auf bestimmte Reize zwar mit Proliferation und erhöhter GFAP-Expression reagieren, aber trotz Aktivierung kein Vimentin exprimieren.

Alle Tiere mit Entzündung wiesen ebenfalls erhöhte Vimentin- und/oder GFAP-Expression auf. Die beiden Tiere der Gruppe VII hatten stark erhöhte Werte bei beiden Intermediärfilamenten, während die BDV-positive Mutter nur eine mäßige Vermehrung Vimentin-positiver Zellen zeigte. Das ist erstaunlich, da anhand der Ergebnisse der anderen durchgeführten Färbungen davon ausgegangen werden kann, dass sie einen ähnlichen Ansteckungsverlauf, nämlich im adulten Alter durch die Wurfgeschwister beziehungsweise Jungen nahmen. Möglicherweise liegt der Unterschied in der Astrozytenreaktion zwischen den Tieren der Gruppe VII und den Muttertieren an dem Reifegrad und/oder der vorhandenen Menge der Astrozyten im Gehirn zum Ansteckungszeitpunkt.

Auch die vier positiven Tiere der Gruppe 19 hatten eine nur mittelgradige Erhöhung angefärbter Zellen bei dem immunhistochemischen Nachweis der Intermediärfilamente. In zwei Fällen waren nur die GFAP-beziehungsweise nur die Vimentin-exprimierenden Zellen vermehrt. Diese insgesamt eher schwache, aber deutliche Astroglia-Reaktion bei allen positiven vier Wochen alten NBAE-Ratten könnte mit dem relativ niedrigen Alter dieser Gruppe

zusammenhängen. Es ist nicht genau bekannt, wann die Reifung der Astrozyten im Gehirn von Nagern vollständig abgeschlossen ist. Möglicherweise reagieren junge Astrozyten nicht so stark auf die durch das Virus verursachten Störungen oder die Proliferation Vimentin- und GFAP-exprimierender Zellen ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht so stark vorangeschritten wie bei älteren Tieren. Denkbar wäre auch, dass die Veränderungen in den infizierten Neuronen, die möglicherweise die starke Reaktion der Astrozyten auslösen, zu diesem relativ frühen Zeitpunkt der Infektion noch nicht vollzogen sind. Obwohl Neurone schon wenige Tage nach Infektion BDV-positiv sind, gehen zum Beispiel viele Purkinje-Zellen im Kleinhirn erst zwischen Tag 27 und 75 p.i. verloren (Bautista *et al.*, 1995; Eisenman *et al.*, 1999; Zocher *et al.*, 2000) und TUNEL-positive Zellen treten erst ab der dritten Woche auf. Möglicherweise sind also Signale, die von apoptotischen Neuronen gegeben werden für die starke Aktivierung der Astrozyten notwendig.

Anders als Mikrogliazellen zeigten Astrozyten auch Aktivierung in vier BDV-negativen Tieren, die weder Infiltrate noch eine Mikrogliose aufwiesen. Alle diese Tiere waren PCR-positiv, hatten aber zum Zeitpunkt der Testung keine BDV-spezifischen Antikörper im Blut. Hier stellt sich die Frage, wodurch die Astrozyten-Reaktion ausgelöst wurde und warum die Mikroglia nicht reagierte, die in den meisten Fällen parallel aktiviert wurde. Da weder Astrozyten noch Neurone bei diesen Tieren BDV-Protein aufwiesen, kann das Virus selbst nicht die Reaktion ausgelöst haben, es sein denn, es kam zu einer transienten Infektion, die zum Todeszeitpunkt nicht mehr vorhanden war. Denkbar wäre auch, dass der Organismus in Kontakt mit dem Virus kam, ohne dass eine Infektion des Gehirns stattfand. Ein solcher Fall könnte bei auf B- und T-Zellebene immuntoleranten Tieren auftreten, was die Anwesenheit von Nukleinsäure im Blut (PCR-positiv) und eine Abwesenheit von zellulären Infiltraten im Gehirn sowie Abwesenheit von Antikörpern im Blut erklären könnte.

Bode *et al.* (2001) berichten, dass BDV-Antigen (gebunden an PBMCs und frei im Plasma) und zirkulierende Immunkomplexe (CICs) bei BDV-Infektionen bei Tier und Mensch vorkommen. Plasma-Antigenämie und CICs könnten zumindest die Detektion von viraler RNA in der Abwesenheit von Antikörpern erklären (Vahlenkamp *et al.*, 2000) und bei den eigenen Fällen möglicherweise nicht für eine Reaktion des spezifischen Immunsystems reichen, aber für die astrozytäre Reaktion verantwortlich sein.

## Nervenzellen

Neben der Beurteilung der Purkinje-Zelldichte in der Nissl-Färbung wurden die Auswirkungen einer BDV-Infektion auf Neurone mit Hilfe des Neurofilament-Markers, der spezifisch für Neurone ist, durchgeführt. Da hierbei vor allem Axone angefärbt werden und Hirngewebe zum überwiegenden Teil aus Nervenzellausläufern besteht, ist es kaum möglich einzelne Zellen zu zählen und zu quantifizieren. Allerdings konnten in den Gehirnen einiger Tiere in drei Arealen eindeutig geschwollene Axone detektiert werden, die dann in diesen gezählt wurden.

Axonale Spheroide, die meistens die terminalen Endbulbi betreffen oder dystrophische Axone, die gewöhnlich weniger stark geschwollen sind als die Spheroide, finden sich in einer Reihe verschiedener neurodegenerativer ZNS-Erkrankungen, einschließlich Schlaganfall (Dewar *et al.*, 1999), Myelinisierungsstörungen (Griffiths *et al.*, 1998), Tauopathien (Lewis *et al.*, 2000; Probst *et al.*, 2000) traumatischen Hirnläsionen (Cheng und Povlishock, 1988), Alzheimer Krankheit (Brendza *et al.*, 2003), Parkinson Krankheit (Galvin *et al.*, 1999) und Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (Liberski und Budka, 1999) und kommen auch während des normalen Alterungsprozesses und sekundär in einigen schwerwiegenden Krankheiten vor (Sung *et al.*, 1981).

In den eigenen Untersuchungen wurden keine Axonschwellungen bei den Kontroll- oder den nicht erfolgreich infizierten Tieren gefunden, wohl aber bei nahezu allen erfolgreich NBAE-infizierten Ratten. Bei den beiden Tieren VII NBAE.2 und 11 NBAE.1, die nur wenige BDV-infizierte Zellen aufwiesen, konnten keine geschwollenen Axone gefunden werden. Da Neurone die Hauptzielzellen des BD-Virus sind, ist es naheliegend, dass das Virus selbst Veränderungen in den Nervenzellen verursacht, die zu Axonschwellungen führen. Weil aber schwerwiegende Veränderungen der Nervenzellen mit Zelltod erst relativ spät im Verlauf der Infektion auftreten, ist es nicht überraschend, dass bei dem 11 Tage alten Tier noch keine Axonschwellungen zu finden waren. Auch unter den vier Wochen alten Tieren mit leichter Entzündung waren in nur zwei Fällen wenige Axonschwellungen zu detektieren. Das spricht dafür, dass in diesem Zeitraum die Schädigungen der Neuronen beginnen morphologisch sichtbar zu werden.

Es ist zu bedenken, dass oft nur einzelne Axonschwellungen sichtbar wurden und im besten Fall nicht mehr als 23 Axonveränderungen im gesamten Cortex gezählt wurden. Auch konnten nur quer angeschnittene Axone eindeutig als verdickt identifiziert werden. Es ist daher nicht auszuschließen, dass das Vorkommen von Axonschwellungen nicht in jedem Fall

erkannt wurde und dass bei Tieren, bei denen keine solchen Veränderungen dokumentiert sind, dennoch Axonschwellungen im Gehirn vorhanden sein können. Das könnte bei den drei Tieren, bei denen keine Axonschwellungen gefunden wurden, die sich aber in der Infektionsausbreitung und der Immun- und Gewebsreaktion nicht von den anderen erfolgreich NBAE-infizierten Versuchstieren unterschieden, der Fall sein. Bei Tier VII NBAE.2, das nur wenige p38-positive Zellen aufwies und außer einer leichten Mikrogliose keine Zellreaktion zeigte, wurden keine Axonschwellungen gefunden. Das überrascht nicht, da die Wahrscheinlichkeit, dass betroffene Axone im Schnitt getroffen werden, bei den wenigen infizierten Neuronen sehr gering ist.

Auch bei den zwei 110 Tage alten Tieren mit Entzündung und den zwei Müttern wurden Axonschwellungen gefunden. Das war zu erwarten, da auch hier Zellschädigung und Zelltod festgestellt wurden. Ob in diesen Fällen dieselben Mechanismen wie bei den neugeborenen infizierten Ratten für die Neuronenveränderung verantwortlich sind und zusätzlich zu der T-Zell-vermittelten Lyse auftreten oder ob die Neuronenschädigung durch die BDV-spezifische Entzündungsreaktion verursacht wird, bleibt jedoch offen. Hier könnten zur Klärung Versuche mit immunsupprimierten adult-infizierten Ratten Aufschluss bringen.

Die Rolle der Axonschwellungen ist noch unklar und es ist nicht bekannt, ob sie bei den verschiedenen Krankheiten eine Folge von gestörtem axonalen Transport sind, ob sie primär die Transportdefekte verursachen oder ob beides der Fall ist (Mi *et al.*, 2005). Gies *et al.* (1998) beobachteten Axonschwellungen bei adult intrazerebral infizierten Ratten einhergehend mit einem Rückgang cholinerg Fasern schon ab Tag 6 p.i. Diese Störungen der physiologischen Prozesse des anterograden axonalen Transportes führen sie entweder auf eine direkte virusinfektionsvermittelte Interferenz oder auf indirekte Mechanismen mittels humoraler Faktoren zurück.

Sowohl bei adult als auch bei neugeborenen BDV-infizierten Ratten kommt es zu Veränderungen im Neurotransmittersystem (Lipkin *et al.*, 1997; Pletnikov *et al.*, 2002c; Solbrig *et al.*, 1996a), was zusammen mit den eigenen Ergebnissen der Neurofilament-Immunhistochemie den Zusammenhang von Axonschwellungen und gestörtem axonalen Transport bestätigt.

Es ist auch möglich, dass Oligodendrozyten eine Rolle bei den Störungen der Neurone spielen. Oligodendrozyten sind im ZNS die myelinbildenden Zellen, die die Neurofilament-Phosphorylierung (de Waegh *et al.*, 1992) und den Durchmesser der Axone beeinflussen (Sanchez *et al.*, 1996; Windenbank *et al.*, 1985). Es ist bekannt, dass Signale, die von myelinbildenden Zellen ausgehen, wichtig für die Lebensfähigkeit von myelinisierten Axonen sind

(Anzini *et al.*, 1997; de Waegh und Brady, 1991; Giese *et al.*, 1992; Griffiths *et al.*, 1998; Yin *et al.*, 1998). BDV infiziert Oligodendrozyten im Gehirn von Ratten und Myelinstrukturveränderungen wurden bei neugeborenen aerosol infizierten Ratten festgestellt (Schepers, *persönliche Mitteilung*). Es ist also auch möglich, dass die hier gefundenen Axonschwellungen nicht Folge von Veränderungen der infizierten Nervenzellen selbst sind, sondern sekundär nach Dysmyelinisierung durch infizierte Oligodendrozyten auftreten.

Es ist bekannt, dass bei neugeborenen intrazerebral BDV-infizierten Ratten Neuronen zugrunde gehen. Es wird bei diesen Tieren von Apoptose der Pyramidenzellen im Neocortex (Hornig *et al.*, 1999), Verlust von Purkinje-Zellen im Kleinhirn (Bautista *et al.*, 1995; Eisenman *et al.*, 1999; Zocher *et al.*, 2000) und der Zerstörung infizierter Neurone im Gyrus dentatus (Hornig *et al.*, 1999; Rubin *et al.*, 1999; Sauder und de la Torre, 1999) mit anschließendem Ersatz durch Gliazellen (Carbone *et al.*, 1991; Hornig *et al.*, 1999; Zocher *et al.*, 2000) berichtet. Da bei den Sagittalschnitten des Gehirns die Anschnittfläche des Hippocampus und damit die zählbare Zellzahl stark variiert, wurde in eigenen Untersuchungen repräsentativ für den Neuronenverlust die Dichte der Purkinje-Zellen im Kleinhirn beurteilt.

Die Purkinje-Zelldichte war bei allen Kontrolltieren und den negativen Tieren unverändert, während sie bei fast allen erfolgreich BDV-infizierten Ratten herabgesetzt war. Außer in zwei Fällen, in denen die Purkinje-Zellschicht nicht eindeutig zu beurteilen war, waren nur keine Veränderungen bei den zwei Tieren zu beobachten, die auch keine Axonschwellungen aufwiesen. Bei dem 11 Tage alten Tier war dieses Ergebnis zu erwarten, da der Verlust von Neuronen erst nach einigen Wochen auftritt. Da bei Tier VII NBAE.2, bei dem auch nur eine geringe astrogläre Reaktion zu finden war, infizierte Zellen nur in Bulbus olfactorius und Cortex zu finden waren, war auch hier ein Neuronenverlust im Kleinhirn nicht zu erwarten. Bei keiner der vier Wochen alten Ratten war die Purkinje-Zelldichte vermindert. Das entspricht bisherigen Beobachtungen, bei denen infizierte Purkinje-Zellen erst zwischen Tag 27 und 75 p.i. verloren gehen (Bautista *et al.*, 1995; Eisenman *et al.*, 1999; Zocher *et al.*, 2000). Obwohl Neurodegeneration bei adult BDV-infizierten Ratten bekannt ist, gibt es keine Berichte über den spezifischen Verlust von Purkinjezellen im Kleinhirn. Beide Mütter in den eigenen Untersuchungen zeigten eine normale Dichte dieser Neurone. Beide zeigten Axonschwellungen, was für pathologische Veränderungen von Nervenzellen spricht, zeigten aber in allen Färbungen insgesamt wenig Reaktion im Kleinhirn. Während bei neonatal-infizierten Ratten die Infektion solche Areale des ZNS schädigt, die postnatal reifen, wozu auch das



Kleinhirn gehört, scheint dieses bei der Infektion der adulten Ratte keine wichtige Rolle zu spielen. Bei dem Modell der adult infizierten Ratte ist es daher wenig sinnvoll, die Purkinje-Zelldichte als Parameter für Nervenzellverlust zu wählen.

Ein Fall, der diesbezüglich keinem der beiden Modelle eindeutig zugeordnet werden kann, stellt das Tier VII NBAE.4 dar. Ein Tier mit Entzündung, das aufgrund der Ergebnisse der anderen Untersuchungen den adult infizierten Tieren zugeordnet wurde. Allerdings war bei dieser Ratte die Purkinje-Zellzahl deutlich vermindert. Geht man davon aus, dass die Mütter repräsentativ für adult infizierte Tiere sind und das Kleinhirn bei diesen wenig betroffen ist, überrascht das Ergebnis bei Tier VII NBAE.4. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei manchen adult infizierten Ratten die Zelldichte in dieser Schicht herabgesetzt sein kann. Es ist auch möglich, dass der Beginn der Infektion bei diesem und den Müttern unterschiedlich verlief. Denkbar, dass die Infektion zu einem Zeitpunkt stattfand, zu dem das Immunsystem so ausgereift war, dass eine Immunantwort wie bei den Muttertieren gegeben wurde, dass sich aber die Purkinjezellen noch in einem Stadium befanden, in dem sie empfänglich für virale Schädigungen waren und zugrunde gingen.

Insgesamt zeigen die eigenen Untersuchungen, dass das BDV, obwohl es ein nicht-zytopathogenes Virus ist, auch in immuntoleranten Tieren starke Veränderungen in verschiedenen Zellarten des Gehirns hervorruft. Bei den bisherigen Untersuchungen an neugeborenen infizierten Ratten, bei denen die Tiere intrazerebral infiziert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass beispielsweise die beobachtete Mikrogliose oder Astrozytose durch die mechanische Verletzung des Gewebes und nicht durch das Virus selbst hervorgerufen wurden. Bei der in den eigenen Untersuchungen verwendeten Aerosol-Methode kann hingegen davon ausgegangen werden, dass alle beobachteten pathologischen Veränderungen auf die Infektion selbst zurückzuführen sind.

Die Mehrzahl der am ersten Lebenstag infizierten Tiere wies eine starke Expression des p38-Protein in allen Hirnarealen und eine deutliche Mikro- und Astroglie sowie Neuronenschädigungen und Neuronenverlust auf. In Abwesenheit einer spezifischen Immunreaktion und bei Ausschluss eines mechanischen Insults können eine Mikroglie und eine Astrozytose als ein direkter Viruseffekt und damit als Marker für eine Infektion gewertet werden. Dass diese Zellreaktionen auch bei den sehr alten NBAE-infizierten Ratten nicht

nachliessen, lässt vermuten, dass eine Mikrogliose und Astrozytose bei persistent infizierten Tieren lebenslang besteht.

Es gibt Indizien dafür, dass die Virusausbreitung schneller erfolgt als bei den bisher bekannten Methoden der Infektion, was in weiteren Untersuchungen an jungen Tieren zu Beginn der Infektion bestätigt werden könnte. Eine Dosisabhängigkeit konnte bei erfolgreich infizierten Tieren nicht festgestellt werden und die Gewebsreaktion ließ auch bei besonders alten Tieren nicht nach. Jedoch war die Infektion nicht in allen Fällen an Tag 1 erfolgreich und höhere Virusdosen scheinen die Wahrscheinlichkeit für das Angehen einer Infektion wahrscheinlicher zu machen. Unter den Tieren, die mit niedrigeren Dosen infiziert worden waren, gab es einzelne Fälle, die trotz leichter astroglärer Reaktion BDV-negativ waren, als auch solche, die mit einer Entzündung ähnlich der der positiven Mutter reagierten, was für eine spätere Infektion durch die bereits infizierten Wurfgeschwister im adulten Alter spricht. Bestätigt werden konnte in den eigenen Untersuchungen der neugeborenen aerosol-infizierten Tiere auch eine transiente Infiltration von Lymphozyten im Alter von vier Wochen wie sie bei intrazerebral neugeborenen infizierten Ratten beschrieben wird (Weissenböck *et al.*, 2000). Es trat eine starke Infiltration bei adult infizierten Ratten auf, die aufgrund der Morphologie und Lokalisation der Zellen und deren Anfärbung in der CD45 und CD8-Immunhistochemie vermutlich eine spezifische Immunantwort darstellen dürfte.

Weiterhin sprechen die Untersuchungen dafür, dass persistent infizierte Ratten Virus ausscheiden, an dem sich Kontakttiere anstecken können.

In zwei Fällen zeigten sich Bilder, die so bisher in der Literatur nicht beschrieben wurden. Zum einen ein Muttertier, das zwar die Immun- und Gewebsreaktion aufwies, wie es bei adult infizierten Ratten typisch ist, bei der aber kein BDV-Protein nachgewiesen werden konnte. Zum anderen ein Tier (VII NBAE.2), das BDV-Protein nur in wenigen Zellen exprimierte und außer einer leichten Erhöhung GFAP-exprimierender Zellen keine pathologischen morphologischen Auffälligkeiten zeigte.

Überraschend ist auch die Beobachtung, dass sowohl Sentinels als auch einige NBAE-infizierte Tiere ohne BDV-positive Zellen mit einer Astrogliose reagierten.

## 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer nicht-invasiven Borna Disease Virus (BDV)-Infektion auf das Gehirn von neugeborenen infizierten Ratten untersucht. Diese Methode repräsentiert die allgemein anerkannte Route der intranasalen Infektion bei der Borna Krankheit. Bei bisherigen Untersuchungen wurden neugeborene Ratten intrazerebral infiziert, was eine wesentliche Belastung für das Hirngewebe mit sich bringt. Die mechanischen Schädigungen des Hirngewebes durch die Nadel einerseits und die Deposition des Inokulums andererseits können nicht klar von den Folgen der Infektion abgegrenzt werden. Um diese bisher unvermeidlichen und unterschätzten Folgen zu vermeiden, wurden Aerosole mit definierten Partikelgrößen aus virushaltigem Hirngewebe hergestellt und zur Infektion verwendet. In den eigenen Untersuchungen wurden neugeborenen infizierte Lewis Ratten sowie Positiv- und Negativkontrollen und Sentinels verwendet.

Von den Gehirnen der Tiere wurden Paraffinschnitte angefertigt und neben Standardfärbungen immunhistochemische Färbungen mit Markern für BDV-Protein, Immunzellen, Astrozyten und Neurone durchgeführt.

18 von 30 neugeborenen infizierten Ratten im Alter zwischen 90 und 740 Tagen zeigten das typische Bild der persistierenden toleranten Infektion wie keine oder wenige klinische Symptome in Abwesenheit einer spezifischen Immunantwort. Diese Ratten exprimierten BDV-Protein in Zellen aller Gehirnregionen, zeigten Mikrogliose und aktivierte Astrozyten und die Purkinjezellen im Kleinhirn waren deutlich reduziert. Zusätzlich wurden bei 15 Tieren Axonschwellungen als Anzeichen einer neuronalen Dysfunktion festgestellt.

Einige der neugeborenen aerosol infizierten Ratten, die vier Wochen nach Aerosolexposition untersucht wurden, wiesen neben einer leichten Mikroglia- und Astrozytenreaktion auch gefäßassoziierte Infiltrate auf. Da die infiltrierenden Zellen in der Immunhistochemie mit dem Anti-CD8-Antikörper negativ blieben, ist anzunehmen, dass es sich hierbei um eine transiente unspezifische Immunantwort handelt. Außerdem zeigte eine elf Tage alte Ratte BDV-Protein nur in einzelnen Zellen im Mittel- und Stammhirn und außer einer geringgradigen Mikrogliose keine pathologischen Veränderungen.

Diese frühen Veränderungen nach Aerosolexposition werden als der Beginn einer erfolgreichen intranasalen Infektion angesehen und die beobachteten histomorphologischen Veränderungen können als frühe Ereignisse der Pathogenese nach nicht-invasiver BDV-Infektion generalisiert werden.

Im Gegensatz zu der Mehrzahl der untersuchten Ratten zeigten einige neugeborenen infizierte Tiere andere histomorphologische Veränderungen. Zwei 110 Tage alte aerosol-infizierte Ratten wiesen eine wahrscheinlich BDV-spezifische Immunantwort auf. Beide Tiere zeigten Infiltrate mit CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, eine deutliche Mikrogliose und aktivierte Astrozyten.

Wahrscheinlich war bei diesen Tieren die Infektion am ersten Lebenstag nicht erfolgreich und die Aufnahme von BDV, vermutlich von infizierten und virusausscheidenden Geschwistertieren, führte in höherem immunkompetenten Alter zur Infektion. Dies trifft auch für die Muttertiere zu, von denen beide eine deutliche Entzündungsreaktion, aber nur eines Virus-Protein in den Zellen aufwiesen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß eine nicht-invasive BDV-Infektion kurz nach der Geburt zu einem anderen Krankheitsverlauf als bei Tieren, die in eine anderen Lebensphase infiziert werden, führt: während spezifische Immunreaktionen nicht vorkommen, stehen unspezifische Entzündungs- und Hirngewebsreaktionen im Vordergrund, die lebenslang bestehen bleiben. Diese führen zu Funktionsstörungen und Strukturveränderungen verschiedener Gehirnzellen. Es bleibt zu klären, ob und inwieweit diese Hirnveränderungen mit den beschriebenen Verhaltensanomalien der Tiere in Zusammenhang stehen.

## 7 Summary

This work analyzes the effects of non-invasive Borna disease virus (BDV) infection on the brains of newborn rats, representing the commonly accepted route of intranasal infection in Borna disease. In previous studies newborns were usually infected by the intracerebral route, representing a serious stress to the brain tissue. Insertion of the needle and deposition of the inoculum cause mechanical effects on the brain tissue *a priori* not distinguishable from those caused by the viral infection. To avoid this so far inevitable and underestimated effect, aerosols with defined particle sizes were generated from virus-containing brain tissue to infect the animals.

Newborn infected Lewis rats together with negative and positive controls and sentinels were used in these investigations.

Paraffin-embedded sections of the brains were stained with haematoxylin and eosin (HE) and cresyl violet (KV) and immunohistochemistry was carried out to detect BDV protein, immune cells, astrocytes and neurons.

Eighteen of 30 newborn infected rats between 90 and 740 days of age showed the typical pattern of persistent tolerant infection, i.e. no or only minor clinical symptoms in the absence of a specific immune response. These rats expressed BDV proteins in cells of all brain regions; microgliosis and activated astrocytes were seen and Purkinje cells in the cerebellum were clearly reduced. In addition, axonal swellings as signs of neuronal dysfunction were detected in the brains of 15 rats.

Several neonatal aerosol infected rats examined four weeks after exposition to aerosol showed vessel associated infiltrates in addition to a moderate microgliosis. Due to the fact that these infiltrating cells did not express CD8, a transient non-specific immune response is suggested. In addition one eleven day old rat showed BDV protein only in a few cells of the midbrain and brainstem and had no other pathological changes other than moderate microgliosis. These early findings after aerosol exposition are regarded as beginning of a successful intranasal infection and the observed histomorphological changes might be generalized in terms of early events of pathogenesis after non-invasive BDV infection.

In contrast to the majority of examined rats, some newborn infected animals showed different patterns of histomorphological alterations. Two 110 day old aerosol infected rats showed infiltrates containing CD8<sup>+</sup>-T-cells, distinct microgliosis and activated astrocytes, which can be considered a BDV-specific immune response. These rats were probably not successfully

infected as newborns and the later uptake of BDV, most probably from infected and virus excreting littermates, led to an infection in an immunocompetent age. This is also true for both mothers examined which showed showed a distinct immune reaction but only one had viral protein in cells of the brain.

This work demonstrates that a non-invasive BDV-infection of newborn rats leads to a course of illness different to those shown by animals infected at other ages. While no specific immune responses occur, non-specific immune and cell reactions are prominent and remain a lifetime. These reactions cause functional and structure changes in different brain cell types. It remains unclear if and to what extent these pathological changes in the brain are connected to the described behaviour changes.

## 8 Literaturverzeichnis

- Allmang U, Hofer M, Herzog S, Bechter K, Staeheli P (2001).** Low avidity of human serum antibodies for Borna disease virus antigens questions their diagnostic value. *Mol Psychiatry* 6: 329
- Aloisi F, Penna G, Cerase J, Menendez IB, Adorini L (1997).** IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes. *J Immunol* 159:1604
- Alonso G, Privat A (1993).** Reactive astrocytes involved in the formation of lesional scars differ in the mediobasal hypothalamus and in other forebrain regions. *J Neurosci Res* 34: 523
- Altshuler LL, Conrad A, Kovelman JA, Scheibel A (1987).** Hippocampal pyramidal cell orientation in schizophrenia. A controlled neurohistologic study of the Yakovlev collection. *Arch Gen Psychiatry* 44: 1094
- Amsterdam JD, Winokur H, Dyson W, Herzog S, Rott R, Koprowski H (1985).** Borna disease virus: a possible etiologic factor in human affective disorders? *Arch Gen Psychiatry* 42: 1093
- Anderson GM (1994).** Studies on the neurochemistry of autism. In: *The Neurobiology of Autism*, Bauman ML, Kemper TL (eds.) John Hopkins University Press: Baltimore, pp. 227
- Anzini P, Neubergh DDH, Schachner M, Nelles E, Willecke K, Zielasek J, Toyka KV, Suter U, Martini R (1997).** Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein connexin 32. *J Neurosci* 17: 4545
- Bahmani MK, Nowrouzian I, Nakaya T, Nakamura Y, Hagiwara K, Takahashi H, Rad MA, Ikuta K (1996).** Varied prevalence of Borna disease virus infection in Arabic, thoroughbred and their cross-bred horses in Iran. *Virus Res* 45: 1
- Bajramovic JJ, Münter S, Syan S, Nehrbass U, Brahic M, Gonzalez-Dunia D (2003).** Borna disease virus glycoprotein is required for viral dissemination in neurons. *J Virol* 77: 12222
- Batra A, Planz O, Bilzer T, Stitz L (2003).** Precursors of Borna disease virus-specific T cells in secondary lymphatic tissue of experimentally infected rats. *J Neurovirol* 9: 325
- Bautista JR, Rubin SA, Moran TH, Schwartz GJ, Carbone KM (1995).** Developmental injury to the cerebellum following perinatal Borna disease virus infection. *Brain Res Dev Brain Res* 90: 45
- Bautista JR, Schwartz GJ, de la Torre JC, Moran TH, Carbone KM (1994).** Early and persistent abnormalities in rats with neonatally acquired Borna disease virus infection. *Brain Res Bull* 34: 31

**Becht H, Rott R (1995).** In: *Encyclopedia of Virology, 1999: 167 Academic Press*, Ed: A. Granoff, R.G. Webster

**Beck A, Frohböse H (1926).** Die enzootische Encephalitis des Schafes. Vergleichende experimentelle Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirnrückenmarksentzündung der Pferde und Schafe. *Arch Tierheilkd* 54: 84

**Benveniste EN (1997).** In: *Immunology of the Nervous System*, eds. Keane, R. W. & Hickey, W. F. (Oxford Univ. Press, New York), pp. 419

**Berg AL, Berg M (1998).** A variant form of feline Borna disease. *J Comp Path* 119: 323

**Berg AL, Dorries R, Berg M (1999).** Borna disease virus infection in racing horses with behavioral and movement disorders. *Arch Virol* 144:547

**Berg M, Johansson M, Montell H, Berg AL (2001).** Wild birds as a possible natural reservoir of Borna disease virus. *Epidemiol Infect* 127: 173

**Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT (1972).** Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 43: 429

**Bignami A, Raju T, Dahl D (1982).** Localization of vimentin, the nonspecific intermediate filament protein, in embryonal glia and in early differentiating neurons. *In vivo* and *in vitro* immunofluorescence study of the rat embryo with vimentin and neurofilament antisera. *Dev Biol* 91: 286

**Billich C (2002).** Charakterisierung von Borna disease Virus-spezifischen Antikörpern in Human und Tierseren. *Abteilung Virologie, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 2002.*

**Billich C, Sauder C, Frank R, Herzog S, Bechter K, Takahashi K, Peters H, Staeheli P, Schwemmle M (2002).** High-avidity human serum antibodies recognizing linear epitopes of Borna disease virus proteins. *Biol Psychiatry* 51: 979

**Bilzer T, Grabner A, Stitz L (1996).** Immunopathologie der Borna-Krankheit beim Pferd: klinische, virologische und neuropathologische Befunde. *Tierärztl Prax* 24: 567

**Bilzer T, Planz O, Lipkin WI, Stitz L (1995).** Presence of CD4- and CD8-T cells and expression of MHC class I and MHC class II antigen in horses with Borna disease virus-induced encephalitis. *Brain Pathol* 3:223

**Bilzer T, Stitz L (1994).** Immune-mediated brain atrophy - CD8 T-cells contribute to tissue destruction during Borna disease. *J Immunol* 153: 818

**Bilzer T, Stitz L (1996).** Immunopathogenesis of virus diseases affecting the central nervous system. *Crit Rev Immunol* 16: 145

**Bode L (1995).** Human infections with Borna disease virus and potential pathogenic implications. In: *Koprowski H, Lipkin WI (eds.). Borna Disease. Curr Top Microbiol Immunol* 190: 103



- Bode L (1999).** Borna Disease Virus – natürliche Infektion und Krankheit bei Tier und Mensch. *Habilitationsschrift, Berlin*
- Bode L, Dürrwald R, Ludwig H (1994).** Borna virus infections in cattle associated with fatal neurological disease. *Veterinary Record* 135: 283
- Bode L, Reckwald P, Severus WE, Stoyloff R, Ferszt R, Dietrich DE, Ludwig H (2001).** Borna disease virus-specific circulating immune complexes, antigenemia, and free antibodies—the key marker triplet determining infection and prevailing in severe mood disorders. *Mol Psychiatr* 6: 481
- Bode L, Steinbach F, Ludwig H (1994).** A novel marker for Borna disease virus infection. *Lancet* 343: 297
- Bode L, Stoyloff R, Ludwig H (2000).** Human bornaviruses and laboratory strains. *Lancet* 355: 1462
- Borland R, McDonald N (1965).** Feline encephalomyelitis. *Br Vet J* 121: 479
- Brendza RP, O'Brien C, Simmons K, McKeel DW, Bales KR, Paul SM, Olney JW, Sanes JR, Holtzman DM (2003).** PDAPP;YFP double transgenic mice: a tool to study amyloid- $\beta$  associated changes in axonal, dendritic and synaptic structures. *J Comp Neurol* 456: 375
- Briese T, Hornig M, Lipkin WI (1999).** Bornavirus immunopathogenesis in rodents: models for human neurological diseases. *J Neurovirol* 6: 604
- Briese T, Lipkin WI, de la Torre JC (1995).** Molecular biology of Borna disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 1
- Briese T, Schneemann A, Lewis AJ, Park Y-S, Kim S, Ludwig H, Lipkin WI (1994).** Genomic organization of Borna disease virus. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 91: 4362
- Canolle B, Masméjean F, Melon C, Nieoullon A, Pisano P, Lortet S (2004).** Glial soluble factors regulate the activity and expression of the neuronal glutamate transporter EAAC1: implication of cholesterol. *J Neurochem* 88:1521
- Caplazi P, Ehrensperger F (1998).** Spontaneous Borna disease in sheep and horses: immuno-phenotyping of inflammatory cells and detection of MHC-I and MHC-II antigen expression in Borna encephalitis lesions. *Vet Immunol Immunopathol* 61: 203
- Caplazi P, Melzer K, Goetzmann R, Rohner-Cotti A, Bracher V, Zlinszky K, Ehrensperger F (1999).** Borna disease in Switzerland and in the principality of Liechtenstein. *Schweiz Arch Tierheilkd* 141:521
- Caplazi P, Waldvogel A, Stütz L, Braun U, Ehrensperger F (1994).** Borna disease in naturally infected cattle. *J Comp Pathol* 111: 65

- Carbone KM, Duchala CS, Griffin JW, Kincaid AL, Narayan O (1987).** Pathogenesis of Borna disease in rats: evidence that intra-axonal spread is the major route for virus dissemination and the determinant for disease incubation. *J Virol* 61: 3431
- Carbone KM, Park SW, Rubin SA, Waltrip II RW, Vogelsang GB (1991).** Borna disease: association with a maturation defect in the cellular immune response. *J Virol* 65: 6154
- Carbone KM, Rubin SA, Sierra-Honigmann AM, Lederman HM (1993).** Characterization of a glial cell line persistently infected with Borna disease virus (BDV): influence of neurotrophic factors on BDV protein and RNA expression. *J Virol* 67:1453
- Carbone KM, Silvas PM, Rubin SA, Vogel M, Moran TH, Schwartz G (1996).** Quantitative correlation of viral induced damage to the hippocampus and the spatial learning and memory deficits. *J Neurovirol* 2: 195
- Chalmers RM, Thomas DR, Salmon RL (2005).** Borna disease virus and the evidence for human pathogenicity: a systematic review. *Q J Med* 98: 255
- Cheng CLY, Povlishock JT (1988).** The effect of traumatic brain injury on the visual system: a morphologic characterization of reactive axonal change. *J Neurotrauma* 5: 47
- Conzelmann KK (1998).** Nonsegmented negative-strand RNA viruses: genetics and manipulation of viral genomes. *Annu Rev Genet* 32: 123
- Cooper JR, Bloom FE, Roth RH (1991).** *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. Oxford University Press; New York, pp.332
- Cserr HF, Knopf PM (1992).** Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today* 13: 507
- Cubitt B, Ly C, de La Torre JC (2001).** Identification and characterization of a new intron in Borna disease virus. *J Gen Virol* 82: 641
- Cubitt B, Oldstone C, de la Torre JC (1994).** Sequence and genome organization of Borna disease virus. *J Virol* 68: 1382
- Dani JW, Chernjavsky A, Smith SJ (1992).** Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 8:429
- Daniels M, Brown DR (2001).** Astrocytes regulate N-methyl-D-aspartate receptor subunit composition increasing neuronal sensitivity to excitotoxicity. *J Biol Chem* 276:22446
- Dauphin G, Legay V, Pitel P-H, Zientara S (2002).** Borna Disease: current knowledge and virus detection in France. *Vet Res* 33:127
- Dauphin G, Legay V, Sailleau C, Smondack S, Hammoumi S, Zientara S (2001).** Evidence of Borna disease virus genome detection in French domestic animals and in foxes (*Vulpes vulpes*). *J Gen Virol* 82: 2199
- De la Torre JC (2002).** Bornavirus and the brain. *J Infect Dis* 186: 241

**De la Torre JC, Carbone KM, Lipkin WI (1990).** Molecular characterization of the Borna disease agent. *Virology* 197: 853

**De la Torre, J. C. (1994).** Molecular biology of Borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses. *J Virol* 68: 7669

**De Waegh SM, Brady ST (1991).** Local control of axonal properties by Schwann cells: Neurofilaments and axonal transport in homologous and heterologous nerve grafts. *J Neurosci Res* 30: 201

**De Waegh SM, Lee VMY, Brady ST (1992).** Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 68: 451

**Degiorgis MP, Berg AL, Hard C, Segerstad AF, Morner T, Johansson M, Berg M (2000).** Borna disease in a free ranging lynx (*Lynx lynx*). *J Clin Microbiol* 38: 3087

**Deschl U, Stitz L, Herzog S, Frese K, Rott R (1990).** Determination of immune cells and expression of major histocompatibility complex class II antigen in encephalitic lesions of experimental Borna disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 81: 41

**Dewar D, Yam P, McCulloch J (1999).** Drug development for stroke: importance of protecting cerebral white matter. *Eur J Pharmacol* 375: 41

**Dhandapani KM, Hadman M, De SL, Wade MF, Mahesh VB, Brann DW (2003).** Astrocyte protection of neurons: role of transforming growth factor-beta signaling via a c-Jun-AP-1 protective pathway. *J Biol Chem* 278:43329

**Dieckhöfer R, Bode L, Ludwig H, Kiefer M, Reckwald P, Rupp A (2004).** Bornavirus (BDV) beim Pferd: Klinik, Diagnostik und Therapie bei einem lokalen Infektionsgeschehen im Saarland und tierseuchenrechtliche Betrachtungen. *Tierärztl Umschau* 59 (11): 619

**Dietz DM, Pletnikov MV (2003).** Postnatal weight gain inhibition does not account for neurobehavioral consequences of neonatal Borna disease virus infection. *Physiol Behav* 80: 359

**Dittrich W, Bode L, Kao M, Schneider K (1989).** Learning deficiencies in Borna disease virus-infected but clinically healthy rats. *Biol Psychiatry* 26: 818

**Dürrwald R, Ludwig H (1997).** Borna disease virus (BDV), a (zoonotic?) worldwide pathogen. A review of the history of the disease and the virus infection with comprehensive bibliography. *Zentbl Veterinärmed B* 44: 147

**Dyer MA, Cepko CL (2000).** Control of Muller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nat Neurosci* 3: 873

**Eickmann M, Kiermayer S, Kraus I, Gössl M, Richt JA, Garten W (2005).** Maturation of Borna disease virus glycoprotein. *FEBS Letters* 579: 4751

- Eisenman LM, Brothers R, Tran MH, Kean RB, Dickson GM, Dietzschold B, Hooper DC (1999).** Neonatal Borna disease virus infection the rat causes a loss of PCs in the cerebellum. *J Neurovirol* 5: 181
- Enbergs HK, Vahlenkamp TW, Kipar A, Müller H (2001).** Experimental infection of mice with Borna disease virus (BDV): replication and distribution of the virus after intracerebral infection. *J Neurovirol* 7:272
- Ernst M, Zametkin AJ, Matochik JA, Pascualvaca D, Cohen RM (1997).** Low medial prefrontal dopaminergic activity in autistic children. *Lancet* 350: 638
- Ernst W (1931).** Zur Frage der Encephalitis enzootica infectiosa bei Pferd und Rind. Bornakrankheit und bösartiges Katarrhalfieber. *Arch Tierheilk* 63: 38
- Fankhauser R (1961).** Sporadische Meningo-Encephalomyelitis beim Rind. *Schweiz Arch Tierheilk* 103: 225
- Fattore L, Puddu MC, Picciau S, Cappai A, Fratta W, Serra GP, Spiga S (2002).** Astroglial in vivo response to cocaine in mouse dentate gyrus: a quantitative and qualitative analysis by confocal microscopy. *Neuroscience* 110: 1
- Fish B, Marcus J, Hans SL, Auerbach JG, Perdue S (1992).** Infants at risk for schizophrenia: sequelae of a genetic neurointegrative defect: a review and replication analysis of pndysmaturation in the Jerusalem Infant Development Study. *Arch Gen Psychiatry* 49: 221
- Franke WW, Moll R (1987).** Cytoskeletal components of lymphoid organs. I. Synthesis of cytokeratins 8 and 18 and desmin in subpopulations of extrafollicular reticulum cells of human lymph nodes, tonsils, and spleen. *Differentiation* 36: 145
- Fukuda K, Takahashi K, Iwata Y, Mori N, Gonda K, Ogawa T, Osonoe K, Sato M, Ogata S, Horimoto T, Sawada T, Tashiro M, Yamaguchi K, Niwa S, Shigeta S (2001).** Immunological and PCR analyses for Borna disease virus in psychiatric patients and blood donors in Japan. *J Clin Microbiol* 39: 419
- Furrer E, Bilzer T, Stitz L, Planz O (2001).** Neutralizing antibodies in persistent Borna disease virus infection: prophylactic effect of gp94-specific monoclonal antibodies in preventing encephalitis. *J Virol* 75: 943
- Galabru J, Saron MF, Berg M, Berg AL, Herzog S, Labie J, Zientara S (2000).** Borna disease virus antibodies in French horses. *Vet Rec* 147: 721
- Galou M, Colucci-Guyon E, Ensergueix D, Ridet JL, Gimenez y Ribotta M, Privat A, Babinet C, Dupouey P (1996).** Disrupted glial fibrillary acidic protein in astrocytes from vimentin knockout mice. *J Cell Biol* 133: 853
- Galvin JE, Uryu K, Lee VM, Trojanowski JQ (1999).** Axon pathology in Parkinson's disease and Lewy body dementia contains alpha-, beta-, and gammasynuclein. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13450

- Garcia-Sastre A, Palese P (1993).** Genetic manipulation of negativestrand RNA virus genomes. *Annu Rev Microbiol* 47: 765
- Geiss V, Frese K, Morales JA, Ojok L, Herzog S (1990).** Borna disease virus-induced retinitis in Lewis rats—an immune-mediated retinopathy. *Lens Eye Toxic Res* 7: 741
- Gies U, Bilzer T, Stitz L, Staiger JF (1998).** Disturbance of the cortical cholinergic innervation in Borna disease prior to encephalitis. *Brain Pathol* 8: 39
- Gies U, Göröcs TJ, Mulder J, Planz O, Stitz L, Bilzer T, Luiten PGM, Harkany T (2001).** Cortical cholinergic decline parallels the progression of Borna virus encephalitis. *Clin Neurosci Neuropathol* 12: 3767
- Giese KP, Martini R, Lemke G, Soriano P, Schachner M (1992).** Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons. *Cell* 71: 565
- Gillberg C (1999).** Neurodevelopmental processes and psychological functioning in autism. *Dev Psychopathol* 11: 567
- Goldman S (2003).** Glia as neural progenitor cells. *Trends Neurosci* 26: 590
- Gonzalez-Dunia D, Cubitt B, de la Torre JC (1998).** Mechanism of Borna disease virus entry into cells. *J Virol* 72 :783
- Gonzalez-Dunia D, Sauder C, de la Torre JC (1997).** Borna disease virus and the brain. *Brain Res Bull* 44: 647
- Gonzalez-Dunia D, Watanabe M, Syan S, Mallory M, Masliah E, de la Torre JC (2000).** Synaptic pathology in Borna disease virus persistent infection. *J Virol* 74: 3441
- Gosztonyi G, Kao M, Bode L, Ludwig H (1991).** Obesity syndrome in experimental infection of rats with Borna disease virus. *Clin Neuropathol* 10: 33
- Gosztonyi G, Ludwig H (1995).** Borna disease - neuropathology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 39
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA (1998).** Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 280: 1610
- Guoa LH, Mittelbronn M, Brabeck C, Mueller CA, Schluesener HJ (2004).** Expression of interleukin-16 by microglial cells in inflammatory, autoimmune, and degenerative lesions of the rat brain. *J Neuroimmunol* 146: 39
- Haas B, Becht H, Rott R (1986).** Purification and properties of an intranuclear virus-specific antigen from tissues infected with Borna disease virus. *J Gen Virol* 67: 235

- Hagiwara K, Asakawa M, Liao L, Jiang W, Yan S, Chai J, Oku Y, Ikuta K, Ito M (2001).** Seroprevalence of Borna disease virus in domestic animals in Xinjiang, China. *Vet Microbiol* 80: 383
- Hagiwara K, Kamitani W, Takamura S, Taniyama H, Nakaya T, Tanaka H, Kirisawa R, Iwai H, Ikuta K (2000).** Detection of Borna disease virus in a pregnant mare and her fetus. *Vet Microbiol* 72: 207
- Hagiwara K, Kawamoto S, Takahashi H, Nakamura Y, Nakaya T, Hiramune T, Ishihara C, Ikuta K (1997).** High prevalence of Borna disease virus infection in healthy sheep in Japan. *Clin Diagn Lab Immunol* 4: 339
- Hagiwara K, Momiyama N, Taniyama H, Nakaya T, Tsunoda N, Ishihara C, Ikuta K (1997).** Demonstration of Borna disease virus (BDV) in specific regions of the brain from horses positive for serum antibodies to BDV but negative for BDV RNA in the blood and internal organs. *Med Microbiol Immunol* 186: 19
- Hagiwara K, Nakaya T, Nakamura Y, Asahi S, Takahashi H, Ishihara C, Ikuta K (1996).** Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells obtained from healthy dairy cattle. *Med Microbiol Immunol* 185: 145
- Hallensleben W, Schwemmle M, Hausmann J, Stitz L, Volk B, Pagenstecher A, Staeheli P (1998).** Borna disease virus-induced neurological disorder in mice: infection of neonates results in immunopathology. *J Virol* 72: 4379
- Hallensleben W, Staeheli P (1999).** Inhibition of Borna disease virus multiplication by interferon: cell line differences in susceptibility. *Arch Virol* 144:1209
- Hamner MB, Diamond BI (1996).** Plasma dopamine and norepinephrine correlations with psychomotor retardation, anxiety, and depression in non-psychotic depressed patients: a pilot study. *Psychiatry Res* 64: 209
- Hatalski CG, Kliche S, Stitz L, Lipkin WI (1994).** Neutralizing antibodies in Borna disease virus-infected rats. *J Virol* 69: 741
- Hausmann J, Baur K, Engelhardt KR, Fischer T, Rziha HJ, Staeheli P (2005a).** Vaccine-induced protection against Borna disease in wild-type and perforin-deficient mice. *J Gen Virol* 86: 399
- Hausmann J, Hallensleben W, de la Torre JC, Pagenstecher A, Zimmermann C, Pircher H, Staeheli P (1999).** T cell ignorance in mice to Borna disease virus can be overcome by peripheral expression of the viral nucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9769
- Hausmann J, Pagenstecher A, Baur K, Richter K, Rziha HJ, Staeheli P (2005b).** CD8 T cells require gamma interferon to clear Borna disease virus from the brain and prevent immune system-mediated neuronal damage. *J Virol* 79(21):13509
- Hausmann J, Schamel K, Staeheli P (2001).** CD8-T lymphocytes mediate Borna disease virus-induced immunopathology independently of perforin. *J Virol* 75: 10460

- Heinig (1969).** Die Bornasche Krankheit der Pferde und Schafe. Ein Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren. *RoÈhrer H (ed) Fischer Jena, Vol.4: 83*
- Helps CR, Turan N, Bilal T, Harbour DA, Yilmaz H (2001).** Detection of antibodies to Borna disease virus in Turkish cats by using recombinant p40. *Vet Rec 149: 647*
- Herden C, Schluesenert HJ, Richt JA (2005).** Expression of allograft inflammatory factor-1 and haeme oxygenase-1 in brains of rats infected with the neurotropic Borna disease virus. *Neuropathol Appl Neurobiol 31: 512*
- Herzog S, Frese K, Richt JA, Rott R (1994).** Ein Beitrag zur Epizootiologie der Bornaschen Krankheit beim Pferd. *Wien Tierärztl Monschr 81: 374*
- Herzog S, Kompter C, Frese K, Rott R (1984).** Replication of Borna disease virus in rats: age-dependent differences in tissue distribution. *Med Microbiol Immunol 173: 171*
- Herzog S, Pfeuffer I, Haberzettl K, Feldmann H, Frese K, Bechter K, Richt JA (1997).** Molecular characterization of Borna disease virus from naturally infected animals and possible links to human disorders. *Arch Virol 13: 183*
- Hilbe M, Herrsche R, Kolodziejek J, Nowotny N, Zlinszky K, Ehrensperger F (2006).** Shrews as reservoir hosts of Borna disease virus. *Emerg Infect Dis 12(4): 675*
- Horii Y, Garcia NP, Noviana D, Kono F, Sawada T, Naraki T, Yamaguchi K (2001).** Detection of anti-Borna disease virus antibodies from cats in Asian countries, Japan, Philippines and Indonesia using electrochemiluminescence immunoassay. *J Vet Med Sci 63: 921*
- Hornig M, Solbrig M, Horscroft N, Weissenböck H, Lipkin WI (2001).** Borna disease virus infection of adult and neonatal rats: models for neuropsychiatric disease. *Curr Top Microbiol Immunol 253: 157*
- Hornig M, Weissenböck H, Horscroft N, Lipkin WI (1999).** An infection-based model of neurodevelopmental damage. *Proc Natl Acad Sci USA 96: 12102*
- Ihlenburg H, Brehmer H (1964).** Beitrag zur latenten Borna-Erkrankung des Pferdes. *Monatsh Vet Med 19: 463*
- Inoue Y, Yamaguchi K, Sawada T, Rivero JC, Horii Y (2002).** Demonstration of continuously seropositive population against Borna disease virus in Misaki feral horses, a Japanese strain: a four-year follow-up study from 1998 to 2001. *J Vet Med Sci 64: 445*
- Janeczko K (1993).** Co-expression of GFAP and vimentin in astrocytes proliferating in response to injury in the mouse cerebral hemisphere. A combined autoradiographic and double immunocytochemical study. *Int J Dev Neurosci 11: 139*
- Joest E, Semmler W. (1911).** Weitere Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirn-Rückenmarksentzündung (Bornasche Krankheit) des Pferdes mit besonderer Berücksichtigung des Infektionsweges und der Kerneinschlüsse. *Z Inf Krkh Haustiere 10: 293*

- Johansson M, Berg M, Berg AL (2002).** Humoral immune response against Borna disease virus (BDV) in experimentally and naturally infected cats. *Vet Immunol Immunopathol* 90:23
- Jordan I, Lipkin WI (2001).** Borna disease virus. *Rev Med Virol* 11: 37
- Kaaden OR (2002).** Viruskrankheiten der Tiere. In: *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, Ed. M. Rolle, A. Mayr
- Kacza J, Mohr C, Pannicke T, Kuhr H, Dietze J, Flüss M, Richt JA, Vahlenkamp TW, Stahl T, Reichenbach A, Seeger H (2002).** Changes of the organotypic retinal organization in Borna virus-infected Lewis rats. *J Neurocytol* 30: 801
- Kacza J, Vahlenkamp TW, Enbergs H, Richt JA, Germer A, Kuhrt H, Reichenbach A, Muller H, Herden C, Stahl T, Seeger J (2000).** Neuron – glia interactions in the rat retina infected by Borna disease virus. *Arch Virol* 145: 127
- Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P (1994).** Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 265: 528
- Kamhieh S, Hodgson J, Bode L, Ludwig H, Ward C, Flower RLP (2006).** No evidence of endemic Borna disease virus infection in Australian horses in contrast with endemic infection in other continents. *Arch Virol* 151: 709
- Kamitani W, Ono E, Yoshino S, Kobayashi T, Taharaguchi S, Lee BJ, Yamashita M, Kobayashi T, Okamoto M, Taniyama H, Tomonaga K, Ikuta K (2003).** Glial expression of Borna disease virus phosphoprotein induces behavioral and neurological abnormalities in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8969
- Kao M, Hamir AN, Rupprecht CE, Fu ZF, Shankar V, Koprowski H, Dietzschold B (1993).** Detection of antibodies against Borna disease virus in sera and cerebrospinal fluid of horses in the USA. *Vet Rec* 132: 241
- Kao M, Ludwig H, Gosztanyi G (1984).** Adaptation of Borna disease virus to the mouse. *J Gen Virol* 65:1845
- Katz JB, Alstad D, Jenny AL, Carbone KM, Rubin SA, Waltrip II RW (1998).** Clinical, serologic, and histopathologic characterization of experimental Borna disease in ponies. *J Vet Diagn Invest* 10:338
- Kelsoe JR, Sadovnick AD, Krishjarnarson H, Bergesch P, Mroczkowski-Patker Z, Drennan M, Rapaport MH, Flodman P, Spence MA, Remick RA (1996).** Possible locus for bipolar disorder near the dopamine transporter on chromosome 5. *Am J Med Genet* 67: 533
- Kemper TL, Bauman ML (1993).** The contribution of neuropathologic studies to the understanding of autism. *Neurol Clin* 11: 175
- Kesslak JP, Nieto-Sampedro M, Globus J, Cotman CW (1986).** Transplants of purified astrocytes promote behavioral recovery after frontal cortex ablation. *Exp Neurol* 92:377



- Kinnunen PM, Billich C, Ek-Kommonen C, Henttonen H, Kallio RK, Niemimaa J, Palva A, Staeheli P, Vaheri A, Vapalahti O (2006).** Serological evidence for Borna disease virus infection in humans, wild rodents and other vertebrates in Finland. *J Clin Virol* 38(1): 64
- Kiupel H, Wehr J (1980).** Zum Vorkommen der sporadischen bovinen Enzephalomyelitis (SBE) im Norden der DDR. *Wiss Z Humboldt-Universität Berlin, Math-Nat R* 29: 57
- Kliche S, Briese T, Henschen A H, Stitz L, Lipkin WI (1994).** Characterization of a Borna disease virus glycoprotein, gp18. *J Virol* 68: 6918
- Kloss CUA, Kreutzberg GW, Raivich G (1997).** Proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer: characterization of stimulatory and inhibitory cytokines. *J Neurosci Res* 49: 248
- Kobayashi T, Shoya Y, Koda T, Takashima I, Lai PK, Ikuta K, Kakinuma M, Masahiko K (1998).** Nuclear targeting activity associated with the amino terminal region of the Borna disease virus nucleoprotein. *Virology* 243: 188
- Kohno T, Goto T, Takasaki T, Morita C, Nakaya T, Ikuta K, Kurane I, Sano K, Nakai M (1999).** Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *J Virol* 73: 760
- KroneviT, Nordstrom M, Moreno W, Nilsson PO (1974).** Feline ataxia due to nonsuppurative meningoencephalomyelitis of unknown aetiology. *Nordisk Veterinaermed* 26: 720
- Lange H, Herzog S, Herbst W, Schliesser T (1987).** Seroepidemiologische Untersuchungen zur Bornaschen Krankheit der Pferde. *Tierärztl Umschau* 42: 938
- Lee BJ, Watanabe M, Kamitani W, Baba S, Yamashita M, Kobayashi T, Tomonaga K, Ikuta K (2003).** Age- and host-dependent control of Borna disease virus spread in the developing brains of gerbils and rats. *Microbes Inf* 5: 1195
- Lenz G, Manozzo L, Gottardo S, Achaval M, Salbego C, Rodnight R (1997).** Temporal profiles of the in vitro phosphorylation rate and immunocontent of glial fibrillary acidic protein after kainic acid-induced lesions in area CA1 of the rat hippocampus: demonstration of a novel phosphoprotein associated with gliosis. *Brain Res* 764: 188
- Lenzlinger PM, Morganti-Kossmann MC, Laurer HL, McIntosh TK (2001).** The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury. *Mol Neurobiol* 24:169
- Levitsky DA, Strupp BJ (1995).** Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns. *J Nutr* 125: 2212S
- Lewis AJ, Whitton JL, Hatalski CG, Weissenböck H, Lipkin WI (1999).** Effect of Immune Priming on Borna disease. *J Virol* 73: 2541

- Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M (2000).** Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet* 25: 402
- Liberski PP, Budka H (1999).** Neuroaxonal pathology in Creutzfeldt–Jakob disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 97: 329
- Lim DA, Alvarez-Buylla A (1999).** Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7526
- Lipkin WI, Hatalski CG, Briele T (1997).** Neurobiology of Borna disease virus. *J Neurovirol* 3:S17
- Liu W, Brosnan CF, Dickson DW, Lee SC (1994).** Macrophage colony-stimulating factor mediates astrocyte-induced microglial ramification in human fetal central nervous system culture. *Am J Pathol* 145: 48
- Lord KE, Cook B, Leventhal N, Amaral DG (2000).** Autism spectrum disorders. *Neuron* 28: 355
- Ludwig H, Bode L (2000).** Borna disease virus: new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot* 19: 259
- Ludwig H, Bode L, Gosztanyi G (1988).** Borna disease: a persistent virus infection of the central nervous system. *Prog Med Virol* 35: 107
- Ludwin SK, Kosek JC, Eng LF (1976).** The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. *J Comp Neurol* 165: 197
- Lundgren AL (1992).** Feline non-suppurative meningoencephalomyelitis. A clinical and pathological study. *J Comp Pathol* 107: 411
- Lundgren AL, Czech G, Bode L, Ludwig H (1993).** Natural Borna disease in domestic animals others than horses and sheep. *Zentralbl Veterinarmed [B]* 40: 298
- Lundgren AL, Johannisson A, Zimmermann W, Bode L, Rozell B, Muluneh A, Lindberg R, Ludwig H (1997).** Neurological disease and encephalitis in cats experimentally infected with Borna disease virus. *Acta Neuropathol* 93: 391
- Lundgren AL, Ludwig H (1993).** Clinically diseased cats with non-suppurative meningoencephalomyelitis have Borna disease virus-specific antibodies. *Acta Vet Scand* 34: 101
- Lundgren AL, Zimmermann W, Bode L, Czech G, Gosztanyi G, Lindberg R, Ludwig H (1995).** Staggering disease in cats: isolation and characterization of the feline Borna disease virus. *J Gen Virol* 76: 2215

- Malkinson M, Weisman Y, Ashash E, Bode L, Ludwig H (1993).** Borna disease in ostriches. *Vet Rec* 133: 304
- Matthias D (1954).** Der Nachweis von latent infizierten Pferden, Schafen und Rindern und deren Bedeutung als Virusreservoir bei der Borna'schen Krankheit. *Arch Exp Vet Med* 8: 506
- Metzler A, Ehrensperger F, Danner K (1979).** Borna-virusinfektion bei Schafen: Verlaufsuntersuchungen nach spontaner Infektion, unter besonderer Berücksichtigung der Antikörperkinetik im Serum und Liquor Cerebrospinalis. *Schweiz Arch Tierheilk* 121:37
- Metzler A, Ehrensperger F, Wyler R (1978).** Natural borna virus infection in rabbits. *Zentralbl Veterinärmed* 25: 161
- Metzler A, Frei U, Danner K (1976).** Virologically confirmed outbreak of Borna's disease in a Swiss herd of sheep. *Schweiz Arch Tierheilk* 118: 483
- Mi W, Beirowski B, Gillingwater TH, Adalbert R, Wagner D, Grumme D, Osaka H, Conforti L, Arnhold S, Addicks K, Wada K, Ribchester RR, Coleman MP (2005).** The slow Wallerian degeneration gene, WldS, inhibits axonal spheroid pathology in gracile axonal dystrophy mice. *Brain* 128: 405
- Morales JA (1988).** Immunhistologische Verlaufsuntersuchungen über die Ausbreitung des Virus der Bornaschen Krankheit bei der Lewis-Ratte nach perinataler intrazerebraler Infektion. *Vet Med Diss Universität Giessen, Giessen, Germany*
- Morales JA, Herzog S, Kompter C, Frese K, Rott R (1988).** Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Med Microbiol Immunol* 177: 51
- Morimoto K, Hooper DC, Bornhorst A, Corisdeo S, Bette M, Fu ZF, Schäfer MKH, Koprowski H, Weihe E, Dietzschold B (1996).** Intrinsic responses to Borna disease virus infection of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13345
- Muller-Doblies D, Baumann S, Grob P, Hulsmeier A, Muller-Doblies U, Brunner P, Ehrensperger F, Staeheli P, Ackermann M, Suter M (2004).** The humoral and cellular immune response of sheep against Borna disease virus in endemic and non-endemic areas. *Schweiz Arch Tierheilk* 146: 159
- Nakamura Y, Asahi S, Nakaya T, Bahmani MK, Saitoh S, Yasuki K, Mayama H, Hagiwara K, Ishihara C, Ikuta K (1996).** Demonstration of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells derived from domestic cats in Japan. *J Clin Microbiol* 34: 188
- Nakamura Y, Kishi M, Nakaya T, Asahi S, Tanaka H, Sentsui H, Ikeda K, Ikuta K (1995).** Demonstration of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells from healthy horses in Japan. *Vaccine* 13: 1076
- Nakamura Y, Nakaya T, Hagiwara K, Momiyama N, Kagawa Y, Taniyama H, Ishihara C, Sata T, Kurata T, Ikuta K (1999b).** High susceptibility of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) to Borna disease virus. *Vaccine* 17: 480

- Nakamura Y, Takahashi H, Shoya Y, Nakaya T, Watanabe M, Tomonaga K, Iwahashi K, Ameno K, Momiyama N, Taniyama H, Sata T, Kurata T, de la Torre JC, Ikuta K (2000).** Isolation of Borna disease virus from human brain tissue. *J Virol* 74: 4601
- Nakamura Y, Watanabe W, Kamitani W, Taniyama H, Nakaya T, Nishimura Y, Tsujimoto H, Machida S, Ikuta K (1999a).** High prevalence of Borna disease virus in domestic cats with neurological disorders in Japan. *Vet Microbiol* 70: 153
- Nakaruma Y, Asahi S, Nakaya T, Bahmani MK, Saitoh S, Yasuki K, Mayama H, Hagiwara K, Ishihara C, Ikuta K (1996).** Demonstration of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells derived from domestic cats in Japan. *J Clin Microbiol* 34: 188
- Narayan O, Herzog S, Frese K, Scheefers H, Rott R (1983a).** Behavioral disease in rats caused by immunopathological responses to persistent Borna virus in the brain. *Science* 220:1401
- Narayan O, Herzog S, Frese K, Scheefers H, Rott R (1983b).** Pathogenesis of Borna disease in rats: immune-mediated viral ophthalmoencephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities. *J Infect Dis* 148: 305
- Nebelt J, Hagenau K (1996).** Die Verteilung des Bornavirus in natürlich infizierten Tieren mit klinischer Erkrankung. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 109: 178
- Newman EA (2003).** New roles for astrocytes: Regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* 26: 536
- Nishino Y, Funada M, Fukushima R, Mizutani T, Kimura T, Iizuka R, Hiramami H, Hara H (1999).** Borna disease virus infection in domestic cats: evaluation by RNA and antibody detection. *J Vet Med Sci* 61: 1167
- Nishino Y, Kobasa D, Rubin SA, Pletnikov MV, Carbone KM (2002).** Enhanced neurovirulence of borna disease virus variants associated with nucleotide changes in the glycoprotein and L polymerase genes. *J Virol* 76: 8650
- Nitzschke E (1963).** Untersuchungen über die experimentelle Bornavirus-Infektion bei der Ratte. *Zentbl Vetmed Reihe B* 10: 470
- Nitzschke E, Rott R (1957).** Züchtung des Virus der Bornaschen Krankheit im bebrüteten Hühnerei. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 70: 101
- Norenberg MD (1994).** Astrocyte responses to CNS injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 53: 213
- Nöske K, Bilzer T, Planz O, Stitz L (1998).** Virus-specific CD4<sup>+</sup> T cells eliminate Borna disease virus from the brain via induction of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells. *J Virol* 72: 4387
- Nowotny N, Kolodziejek (2000).** Demonstration of Borna disease virus nucleic acid in a patient with Chronic Fatigue Syndrome. *J Infect Dis* 181:1860

- Nowotny N, Kolodziejek J, Jehle CO, Suchy A, Staeheli P, Schwemmler M (2000).** Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. *J Virol* 74: 5655
- Nowotny N, Weissenböck H (1995).** Description of feline nonsuppurative meningoencephalomyelitis (“staggering disease”) and studies of its etiology. *J Clin Microbiol* 33: 1668
- Okamoto M, Hagiwara K, Kamitani W, Sako T, Hirayama K, Kirisawa R, Tsuji M, Ishihara C, Iwai H, Kobayashi T, Tomonaga K, Ikuta K, Taniyama H (2003).** Experimental vertical transmission of virus in the mouse. *Arch Virol* 148: 1557
- Okamoto M, Kagawa Y, Kamitani W, Hagiwara K, Kirisawa R, Iwai H, Ikuta K, Taniyama H (2002).** Borna disease in a dog in Japan. *J Comp Path* 126: 312
- Oldach D, Zink MC, Pyper JM, Herzog S, Rott R, Narayan O, Clements JE (1994).** Induction of protection against Borna disease by inoculation with high-dose-attenuated Borna disease virus. *Virology* 206: 426
- Ouchi A, Kishi M, Kobayashi T, Lai PK, Malik TH, Kazuyoshi I, Mochizuki M (2001).** Prevalence of circulating antibodies to p10, a non-structural protein of the Borna disease virus in cats with ataxia. *J Vet Med Sci* 63: 1279
- Oyesiku NM, Evans CO, Houston S, Darrell RS, Smith JS, Fulop ZL, Dixon CE, Stein DG (1999).** Regional changes in the expression of neurotrophic factors and their receptors following acute traumatic brain injury in the adult rat brain. *Brain Res* 833: 161
- Partonen T (1996).** Dopamine and circadian rhythms in seasonal affective disorder. *Med Hyp* 47: 191
- Perez M, Sanchez A, Cubitt B, Rosario D, de la Torre JC (2003).** A reverse genetics system for Borna disease virus. *J Gen Virol* 84: 3099
- Perez M, Watanabe M, Whitt MA, de la Torre JC (2001).** N-terminal domain of Borna disease virus G (p56) protein is sufficient for virus receptor recognition and cell entry. *J Virol* 75: 7078
- Petzold A, Eikelenboom MJ, Gveric D, Keir G, Chapman M, Lazeron RH, Cuzner ML, Polman CH, Uitdehaag BM, Thompson EJ, Giovannoni G (2002).** Markers for different glial cell responses in multiple sclerosis: clinical and pathological correlations. *Brain* 125: 1462
- Pindon A, Berry M, Antai D (2000).** Thrombomodulin as a new marker of lesion-induced astrogliosis: involvement of thrombin through the G-protein-coupled protease-activated receptor-1. *J Neurosci* 20: 2543
- Pixley SK, De Vellis J (1984).** Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Dev Brain Res* 15: 201
- Planz O, Bilzer T, Sobbe M, Stitz L (1993).** Lysis of MHC class I-bearing cells in Borna disease virus-induced degenerative encephalopathy. *J Exp Med* 178: 163

- Planz O, Dumrese T, Hulpusch S, Schirle M, Stevanovic S, Stitz L (2001).** A naturally processed rat major histocompatibility complex class I-associated viral peptide as target structure of Borna disease virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *J Biol Chem* 276: 13689
- Planz O, Rziha HJ, Stitz L (2003).** Genetic relationship of Borna disease virus isolates. *Virus Genes* 26: 25
- Planz O, Stitz L (1999).** Borna virus nucleoprotein (p40) is a major target for CD8<sup>+</sup>-T-cell-mediated immune response. *J Virol* 73: 1715
- Plata-Salaman CR, Ilyin S, Gayle D, Romanovitch A, Carbone KM (1999).** Persistent Borna disease virus infection of neonatal rats causes brain regional changes of taRNAs for cytokines, cytokine receptor components and neuropeptides. *Br Res Bull* 49: 441
- Pletnikov MV, Moran TH, Carbone KM (2002a).** Borna disease virus infection of the neonatal rat: developmental brain injury model of autism spectrum disorders. *Front Biosci* 7: D593
- Pletnikov MV, Rubin SA, Schwartz GJ, Carbone KM, Moran TH (2000).** Effects of neonatal rat Borna disease virus (BDV) infection on the postnatal development of monoaminergic brain systems. *Dev Brain Res* 119: 179
- Pletnikov MV, Rubin SA, Schwartz GJ, Moran TH, Sobotka TJ, Carbone KM (1999a).** Persistent neonatal Borna disease virus (BDV) infection of the brain causes chronic emotional abnormalities in adult rats. *Physiol Behav* 66: 823
- Pletnikov MV, Rubin SA, Vasudevan K, Moran TH, Carbone KM (1999b).** Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus (BDV)-infected Lewis rats: a model of autism. *Behav. Brain Res* 100: 30
- Pletnikov MV, Rubin SA, Vogel MW, Moran TH, Carbone KM (2002b).** Effects of genetic background on neonatal Borna disease virus infection-induced neurodevelopmental damage. I. Brain pathology and behavioral deficits. *Brain Res* 944: 97
- Pletnikov MV, Rubin SA, Vogel MW, Moran TH, Carbone KM (2002c).** Effects of genetic background on neonatal Borna disease virus infection-induced neurodevelopmental damage. II. Neurochemical alterations and responses to pharmacological treatments. *Brain Res* 944: 108
- Probst A, Gotz J, Wiederhold KH, Tolnay M, Mistl C, Jatton AL, Hong M, Ishihara T, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Crowther RA, Spillantini MG, Burki K, Goedert M (2000).** Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein. *Acta Neuropathol (Berl)* 99: 469
- Pyo H, Yang MS, Jou I, Joe EH (2003).** Wortmannin enhances lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase expression in microglia in the presence of astrocytes in rats. *Neurosci Lett* 346: 141
- Ransom B, Behar T, Nedergaard M (2003).** New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci.* 26: 520

- Rapin I, Katzman I (1998).** Neurobiology of autism. *Ann Neurol* 43: 7
- Rauer M, Götz J, Schuppli D, Staeheli P, Hausmann J (2004).** Transgenic mice expressing the nucleoprotein of Borna disease virus in either neurons or astrocytes: decreased susceptibility to homotypic infection and disease. *J Virol* 78: 3621
- Ray SK, Dixon CE, Banik NL (2002).** Molecular mechanisms in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Histol Histopathol* 17:1137
- Reeves NA, Helps CR, Gunn-Moore DA, Blundell C, Finnemore PL, Pearson GR, Harbour DA (1998).** Natural Borna disease virus infection in cats in the United Kingdom. *Vet Rec* 7: 523
- Rice AC, Khaldi A, Harvey HB, Salman NJ, White F, Fillmore H, Bullock MR (2003).** Proliferation and neuronal differentiation of mitotically active cells following traumatic brain injury. *Exp Neurol* 183: 406
- Richt JA, Furbringer T, Koch A, Pfeuffer I, Herden C, Bause-Niedrig I, Garten W (1998).** Processing of the Borna disease virus glycoprotein gp94 by the subtilisin-like endoprotease furin. *J Virol* 72: 4528
- Richt JA, Herzog S, Haberzettl K, Rott R (1993).** Demonstration of Borna disease virus-specific RNA in secretions of naturally infected horses by the polymerase chain reaction. *Med Microbiol Immunol* 182: 293
- Richt JA, Pfeuffer I, Christ M, Frese K, Bechter K, Herzog S (1997).** Borna disease virus infection in animals and humans. *Emerg Infect Dis* 3: 343
- Richt JA, Rott R (2001).** Borna disease virus: a mystery as an emerging zoonotic pathogen. *Vet J* 161:24
- Richt JA, Stitz L, Wekerle H, Rott R (1989).** Borna disease, a progressive meningoencephalomyelitis as a model for CD41 T cell-mediated immunopathology in the brain. *J Exp Med* 170: 1045
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997).** Reactive astrocytes: Cellular and molecular cues to biological function. *Trend Neurosci* 20: 570
- Rott R, Becht H (1995).** Natural and experimental Borna disease in animals. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 17
- Rott R, Herzog S, Fleischer B, Winokur A, Amsterdam J, Dyson W, Koprowski H (1985).** Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. *Science* 228: 755
- Rott R, Nitzschke E (1958).** Untersuchungen über die Züchtung des Virus der Bornaschen Krankheit im bebrüteten Hühnerei unter verschiedenen Bedingungen. *Zentralbl Veterinärmed* 5: 629

- Rubin SA, Sierra-Honigmann AM, Lederman HM, Waltrip RW 2<sup>nd</sup>, Eiden JJ, Carbone KM (1995).** Hematologic consequences of Borna disease virus infection of rat bone marrow and thymus stromal cells. *Blood* 85: 2762
- Rubin SA, Sylves P, Vogel M, Moran TH, Schwartz GJ, Pletnikov MV, Carbone KM (1999).** Borna disease virus-induced hippocampal dentate gyrus damage is associated with spatial learning and memory deficits. *Brain Res Bull* 48: 23
- Rubin SA, Waltrip RWD, Bautista JR, Carbone KM (1993).** Borna disease virus in mice: host-species differences in disease expression. *J Virol* 67: 548
- Rugg-Gunn FJ, Eriksson SH, Symms MR, Barker GJ, Thom M, Harkness W, Duncan JS (2002).** Diffusion tensor imaging in refractory epilepsy. *Lancet* 359: 1748
- Sanchez I, Hassinger L, Paskevich PA, Shine HD, Nixon RA (1996).** Oligodendroglia regulate the regional expansion of axon caliber and local accumulation of neurofilaments during development independently of myelin formation. *J Neurosci* 16: 5095
- Sauder C, de la Torre JC (1999).** Cytokine expression in the rat central nervous system following perinatal Borna disease virus infection. *J Neuroimmunol* 96: 29
- Sauder C, Staeheli P (2003).** Rat Model of Borna disease virus transmission: epidemiological implication. *J Virol* 77: 12886
- Sauder C, Wolfer DP, Lipp H, Staeheli P, Hausmann J (2001).** Learning deficits in mice with persistent Borna disease virus infection of the CNS associated with elevated chemokine expression. *Behav Brain Res* 120: 189
- Schamel K, Staeheli P, Hausmann J (2001).** Identification of the immunodominant H-2Kk-restricted cytotoxic T-cell epitope in the Borna disease virus nucleoprotein. *J Virol* 75: 8579
- Schiffer D, Giordana MT, Migheli A, Giaccone G, Pezzotta S, Mauro A (1986).** Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain. *Brain Res.* 374: 110
- Schneemann A, Schneider PA, Lamb RA, Lipkin WI (1995).** The remarkable coding strategy of Borna disease virus: a new member of the nonsegmented negative strand RNA viruses [review]. *Virology* 210: 1
- Schneider PA, Hatalski CG, Lewis AJ, Lipkin WI (1997).** Biochemical and functional analysis of the Borna disease virus G protein. *J Virol* 71: 331
- Schneider U, Naegele M, Staeheli P, Schwemmle M (2003).** Active borna disease virus polymerase complex requires a distinct nucleoprotein-to-phosphoprotein ratio but no viral X protein. *J Virol* 77: 11781
- Schwardt M, Mayer D, Frank R, Schneider U, Eickmann M, Planz O, Wolff T, Schwemmle M (2005).** The negative regulator of Borna disease virus polymerase is a non-structural protein. *J Gen Virol* 86: 3163



**Schwemmle M (2001).** Borna disease virus infection in psychiatric patients: Are we on the right track? *Lancet Infect Dis* 1: 46

**Schwemmle M, Billich C (2004).** The use of peptide arrays for the characterization of monospecific antibody repertoires from polyclonal sera of psychiatric patients suspected of infection by Borna disease virus. *Mol Diversity* 8: 247

**Schwemmle M, Jehle C, Formella S, Staeheli P (1999).** Sequence similarities between human bornavirus isolates and laboratory strains question human origin. *Lancet* 354: 1973

**Sierra-Honigmann AM, Rubin SA, Estafanous MG, Yolken RH, Carbone KM (1993).** Borna disease virus in peripheral blood mononuclear and bone marrow cells of neonatally and chronically infected rats. *J Neuroimmunol* 45: 31

**Slezak M, Pfrieder FW (2003).** New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci* 26: 531

**Smyt MJ, Trapani JA (1998).** The relative role of lymphocyte granule exocytosis versus death receptor-mediated cytotoxicity in viral pathophysiology. *J Virol* 72: 1

**Soares JC, Mann JJ (1997).** The anatomy of mood disorders - review of structural neuroimaging studies. *Biol Psychiatry* 41: 86

**Sobbe M, Bilzer T, Gommel S, Nöske K, Planz O, Stitz L (1997).** Induction of degenerative brain lesions after adoptive transfer of brain lymphocytes from Borna disease virus-infected rats: presence of CD8<sup>+</sup> T cells and perforin mRNA. *J Virol* 71: 2400

**Solbrig MV, Fallon JH, Lipkin WI (1995).** Behavioural disturbances and pharmacology of Borna disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 93

**Solbrig MV, Koob GF, Fallon JH, Lipkin WI (1994).** Tardive dyskinetic syndrome in rats infected with Borna disease virus. *Neurobiol Dis* 1: 111

**Solbrig MV, Koob GF, Fallon JH, Reid S, Lipkin WI (1996b).** Prefrontal cortex dysfunction in Borna disease virus (BDV)-infected rats. *Biol Psychiatry* 40: 629

**Solbrig MV, Koob GF, Joyce JN, Lipkin WI (1996a).** A neural substrate of hyperactivity in Borna disease: changes in brain dopamine receptors. *Virology* 222:332

**Solbrig MV, Koob GF, Lipkin WI (1998).** Cocaine sensitivity in Borna disease virus infected rats. *Pharmacol Biochem Behav* 59: 1047

**Sprankel H, Richarz K, Ludwig H, Rott R (1978).** Behavior alterations in tree shrews (*Tupaia glis*, Diard 1820) induced by Borna disease virus. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 165: 1

**Staeheli P, Sauder C, Hausmann J, Ehrensperger F, Schwemmle M (2000).** Epidemiology of Borna disease virus. *J Gen Virol* 81: 2123.

- Staeheli P, Sentandreu M, Pagenstecher A, Hausmann J (2001).** Alpha/beta interferon promotes transcription and inhibits replication of Borna disease virus in persistently infected cells. *J Virol* 75: 8216
- Stitz L, Bilzer T, Planz O (2002).** The immunopathogenesis of Borna disease virus infection (Review). *Front Biosci* 7:541
- Stitz L, Dietzschold B, Carbone KM (1995).** Immunopathogenesis of Borna disease. In: *Borna Disease*, H. Koprowski and W.I. Lipkin, Eds, Springer-Verlag KG, Berlin: 75
- Stitz L, Krey H, Ludwig H (1981).** Borna disease in rhesus monkeys as a models for uveo-cerebral symptoms. *J Med Virol* 6: 333
- Stitz L, Nöske K, Planz O, Furrer E, Lipkin WI, Bilzer T (1998).** A functional role for neutralizing antibodies in Borna disease: influence on virus tropism outside the central nervous system. *J Virol* 72: 8884
- Stitz L, Planz O, Bilzer T, Frei K, Fontana A (1991).** Transforming growth factor-beta modulates T cell-mediated encephalitis caused by Borna disease virus. Pathogenic importance of CD8+ cells and suppression of antibody formation. *J Immunol.* 147(10): 3581
- Stitz L, Rott R (1994).** In: *Current Topics of Microbiology and Immunology*; Bd.190: 17, Ed. H. Koprowski and W.I. Lipkin
- Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1988).** Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1: 301
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA (1999).** Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57: 563
- Stringer JL (1996).** Repeated seizures increase GFAP and vimentin in the hippocampus. *Brain Res* 717: 147
- Sung JH, Mastro AR, Park SH (1981).** Axonal dystrophy in the gracile nucleus in children and young adults. *J Neuropathol Exp Neurol* 40: 37
- Tanaka J, Maeda N (1996).** Microglial ramification requires nondiffusible factors from astrocytes. *Exp Neurol* 137: 167
- Tapscott SJ, Bennet GS, Toyana Y, Kleinban F, Holtzer H (1981).** Intermediate filament proteins in the developing chick spinal cord. *Dev Biol* 86: 40
- Tomonaga K, Kobayashi T, Lee B-J, Watanabe M, Kamitani W, Ikuta K (2000).** Identification of alternative splicing and negative splicing activity of a nonsegmented negative-strand RNA virus, Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12788
- Tordo N, DeHaan P, Goldbach R, Poch O (1992).** Evolution of negative-stranded RNA genomes. *Semin Virol* 3: 341
- Trapani JA, Sutton VR, Smyth MJ (1999).** CTL granules: evolution of vesicles essential for combating virus infections. *Immunol Today* 20: 351

- Trottier G, Srivastava L, Walker CD (1999).** Etiology of infantile autism: a review of recent advances in genetic and neurobiological research. *J Psychiatry Neurosci* 24: 103
- Tsai LL (1999).** Psychopharmacology in autism. *Psychosom Med* 61: 651
- Tsujimura K, Mizutani T, Kariwa H, Yoshimatsu K, Ogino M, Morii Y, Inagaki H, Arikawa J, Takashima I (1999).** A serosurvey of Borna disease virus infection in wild rats by capture ELISA. *J Vet Med Sci* 61: 113
- Unterstab G, Ludwig S, Anton A, Planz O, Dauber B, Krappmann D, Heins G, Ehrhardt C, Wolff T (2005).** Viral targeting of the interferon- $\beta$ -inducing Traf family member-associated NF- $\kappa$ B activator (TANK)-binding kinase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(38): 13640
- Uyeda CT, Eng LF, Bignami A (1972).** Immunological study of the glial fibrillary acidic protein. *Brain Res* 37: 81
- Vahlenkamp TW, Enbergs HK, Müller H (2000).** Experimental and natural Borna disease virus infections: presence of viral RNA in cells of the peripheral blood. *Vet Microbiol* 76:229
- Vahlenkamp TW, Konrath A, Weber M, Müller H (2002).** Persistence of Borna disease virus in naturally infected sheep. *J Virol* 76: 9735
- Van den Broek MF, Hengartner H (2000).** The role of perforin in infections and tumour surveillance. *Exp Physiol* 85: 681
- Vandevelde M, Braund KG (1979).** Polioencephalomyelitis in cats. *Vet Pathol* 16: 420
- Vesce S, Bezzi P, Volterra A (1999).** The active role of astrocytes in synaptic transmission. *Cell Mol Life Sci* 56: 991
- Vincent VA, Tilders FJ, Van Dam AM (1997).** Inhibition of endotoxininduced nitric oxide synthase production in microglial cells by the presence of astroglial cells: a role for transforming growth factor beta. *Glia* 19: 190
- Vincent VA, Van Dam AM, Persoons JH, Schotanus K, Steinbusch HW, Schoffemeer AN, Berkenbosch F (1996).** Gradual inhibition of inducible nitric oxide synthase but not of interleukin-1 beta production in rat microglial cells of endotoxin-treated mixed glial cell cultures. *Glia* 17: 94
- Vitaliani R, Scaravilli T, Egarter-Vigl E, Giometto B, Klein C, Scaravilli F, An SF, Pramstaller PP (2002).** The pathology of the spinal cord in progressive supranuclear palsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 268
- Von Rheinbaben F, Stitz L, Rott R (1985).** Influence of interferon on persistent infection caused by Borna disease virus in vitro. *J Gen Virol* 66: 2777
- Waelchli RO, Ehrensperger F, Metzler A, Winder C (1985).** Borna disease in a sheep. *Vet Rec* 117:499

- Walker MP, Jordan I, Briese T, Fischer N, Lipkin WI (2000).** Expression and characterization of the Borna disease virus polymerase. *J Virol* 74: 4425
- Walther F (1899).** Gehirn-Rückenmarksentzündung bei Pferden und Schafen in der Amtshauptmannschaft Borna. Mitteilungen aus den Berichten der Bezirksthierärzte auf das Jahr 1899. *Berl Veterinärwesen Königr Sachsen* 44:80
- Waltrip RW 2<sup>nd</sup>, Buchanan RW, Summerfelt A, Breier A, Carpenter WT Jr, Bryant NL, Rubin SA, Carbone KM (1995).** Borna disease virus and schizophrenia. *Psychiatry Res* 56: 33
- Watanabe M, Lee B-J, Kamitani W, Kobayashi T, Taniyama H, Tomanaga K, Ikuta K (2001).** Neurological diseases and viral dynamics in the brains of neonatally Borna disease virus-infected gerbils. *Virology* 282: 65
- Watanabe M, Lee B-J, Yamashita M, Kamitani W, Kobayashi T, Tomonaga K, Ikuta K (2003).** Borna disease virus induces acute fatal neurological disorder in neonatal gerbils without virus- and immune-mediated cell destructions. *Virology* 310: 245
- Wehner T, Ruppert A, Herden C, Frese K, Becht H, Richt JA (1997).** Detection of a novel Borna disease virus-encoded 10 kDa protein in infected cells and tissues. *J Gen Virol* 78: 2459
- Weissenböck H, Hornig M, Hickey WF, Lipkin WI (2000).** Microglial activation and neuronal apoptosis in Borna virus infected neonatal Lewis rats. *Brain Pathol* 10: 260
- Weissenböck H, Nowotny N, Caplazi P, Kolodziejek J, Ehrensperger F (1998a).** Borna disease in a dog with lethal meningoencephalitis. *J Clin Microbiol* 36: 2127
- Weissenböck H, Nowotny N, Zoher J (1994).** Feline meningoencephalomyelitis (staggering disease) in Österreich. *Wiener Tierärztliche Monatschrift* 81: 195
- Weissenböck H, Suchy A, Caplazi P, Herzog S, Nowotny N (1998b).** Borna disease in Austrian horses. *Vet Rec* 143: 21
- Wilson MA, Molliver ME (1994).** Microglial response to degeneration of serotonergic axon terminals. *Glia* 11: 18
- Windenbank AJ, Wood P, Bunge RP, Dyck PJ (1985).** Myelination determines the caliber of dorsal root ganglion neurons in culture. *J Neurosci* 5: 1563
- Wolff T, Burger R, Kurth R (2006a).** Absence of Borna virus in human blood. *J Clin Virol* 36: 314
- Wolff T, Heins G, Pauli G, Burger R, Kurth R (2006b).** Failure to detect Borna disease virus antigen and RNA in human blood. *J Clin Virol* 36(4):309
- Wolff T, Unterstab G, Heins G, Richt JA, Kann M (2002).** Characterization of an unusual importin -binding motif in the Borna disease virus p10 protein that directs nuclear import. *J Biol Chem* 277 (14): 12151

**Wood GS, Warnke R (1981).** Suppression of endogeneous avidin-binding activity in tissues and its relevance for biotin-avidin detection systems. *J Histochem Cytochem* 29: 1196

**Yamaguchi K, Sawada T, Naraki T, Igata-Yi R, Shiraki H, Horii Y, Ishii T, Ikeda K, Asou N, Okabe H, Mochizuki M, Takahashi K, Yamada S, Kubo K, Yashiki S, Waltrip RW 2<sup>nd</sup>, Carbone KM (1999).** Detection of Borna disease virus-reactive antibodies from patients with psychiatric disorders and from horses by electrochemiluminescence immunoassay. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 696

**Yilmaz H, Helps CR, Turan N, Uysal A, Harbour DA (2002).** Detection of antibodies to Borna disease virus (BDV) in Turkish horse sera using recombinant p40. *Arch Virol* 147: 429

**Yin X, Crawford TO, Griffin JW, Tu P, Lee VMY, Li C, Roder J, Trapp BD (1998).** Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *Journal of Neuroscience* 18: 1953

**Zimmermann W, Breter H, Rudolph M, Ludwig H (2000).** Borna disease virus: immunoelectron microscopic characterization of cell-free virus and further information about the genome. *J Virol* 68: 6755

**Zimmermann W, Durrwald R, Ludwig H (1994).** Detection of Borna disease virus RNA in naturally infected animals by a nested polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 46: 133

**Zocher M, Czub S, Schulte-Monting S, de la Torre JC, Sauder C (2000).** Alterations in neurotrophin and neurotrophin receptor gene expression patterns in the rat central nervous system following Borna disease virus infection. *J NeuroVirol* 6: 462

**Zwick W (1939).** Borna'sche Krankheit und Enzephalomyelitis der Tiere. *Handbuch der Viruskrankheiten*, Vol. 2, Ed. *Gildenmeister E, Haagen E, Waldmann O*, pp. 254

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung zur Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5208-0



9 783835 195208